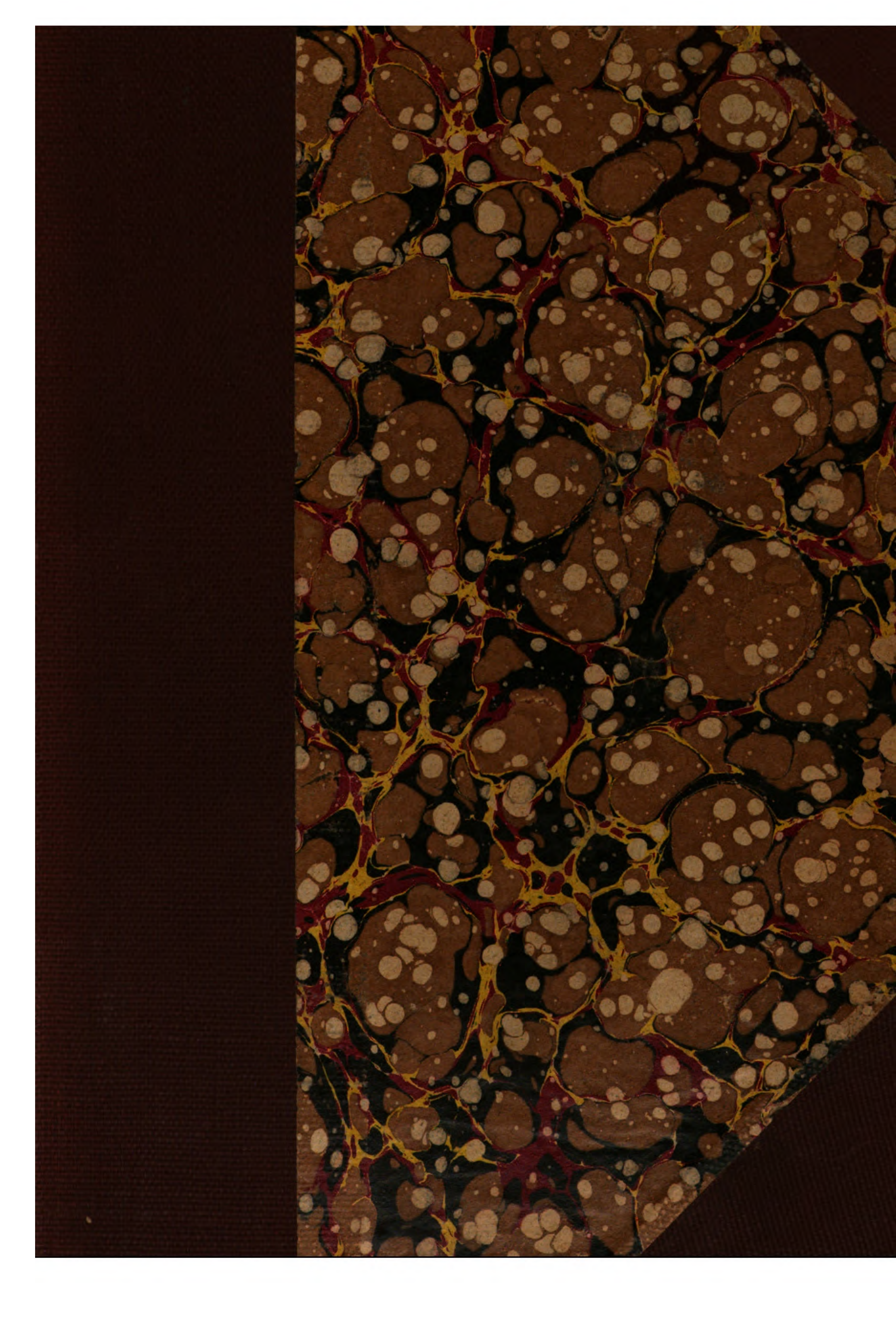
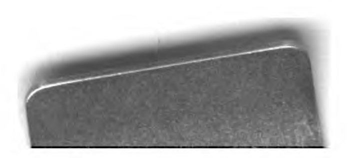



3617
181





Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Straßburg i. Els., **C. von Noorden**-Frankfurt a. M., **E. Salkowski**-Berlin, **A. von Wassermann**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **H. v. Euler**-Stockholm, **J. Feigl**-Hamburg, **S. Flexner**-New York, **J. Forssman**-Lund, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **H. Freundlich**-Berlin-Dahlem, **E. Friedberger**-Greifswald, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **F. Haber**-Berlin-Dahlem, **H. J. Hamburger**-Groningen, **P. Hári**-Budapest, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **V. Henriques**-Kopenhagen, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **A. Koch**-Göttingen, **M. Kumagawa**-Tokio, **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Greifswald, **L. Michaelis**-Berlin, **H. Molisch**-Wien, **J. Morgenroth**-Berlin, **E. Münzer**-Prag, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **P. Rona**-Berlin, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Straßburg, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-Freiburg i. B., **A. Stutzer**-Königsberg i. Pr., **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **P. Trendelenburg**-Rostock, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **O. Warburg**-Berlin, **W. Wiechowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Fünfundneunzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1919.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Nottbohm, F. E. Ist die Milch altmelker Kühe als Säuglingsnahrung geeignet? 1
Halberkann, J. Chinin und Hydrochinin im menschlichen Organismus. Verhalten des Chinins gegen rote Blutkörperchen 24
Lange, C. Über Jod-Stärkereaktion und ihre Verwendung für eine colorimetrische Eiweißbestimmung bei Immunitätsprozessen . . 46
Traube, J. und **Hedwig Rosenstein.** Über die Wirkung von oberflächenaktiven Stoffen auf Pflanzensamen 85
Brinkman, R. Einige Bemerkungen über die Bedeutung des Blutkalks 101
Armbrecht, Walther. Beiträge zur Kenntnis der Chitose 108
Jacoby, Martin. Über Bakterien-Katalase. III. 124
Dienes, L. Studien zur quantitativen Bestimmung sehr geringer Ca-, Mg- und P-Mengen in tierischen Substanzen 131
Trendelenburg, Paul. Quantitative Messungen über die Spaltung des Hexamethylentetramins 146
Tunmann, O. Über die Alkaloide bei Verwundungen der Pflanzen . 164
Boas, Friedrich und **Hans Leberle.** Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. III. 169
Richter-Quittner, M. Zur Methodik der chemischen Blutanalyse. I. Kritik der Enteiweißungsmethoden 179
Vécsei, Anna. Beitrag zur Kenntnis der Hämagglutinine und Hämolysine 205
Acél, D. Über Resistenz der roten Blutkörperchen bei Stickstoffdefizit und bei Inanition 211
Schilling, Karl. Beitrag zur Lehre von der Blutgerinnung 220
Beumer, H. Zur pathogenetischen Bedeutung der Ölsäure bei Anämien 239
Flury, Ferdinand und **Wolfgang Heubner.** Über Wirkung und Entgiftung eingeatmeter Blausäure 249



Seite

Hári, Paul. Über die Lichtabsorption neutraler Lösungen von Oxyhämoglobin 257

Hári, Paul. Ist das Absorptionsverhältnis (Vierordt) ein von der Art des verwendeten Apparats (Spektrophotometer) unabhängiger, charakteristischer Wert? 266

Kornfeld, Klara und **Heinrich Lax.** Untersuchungen über die Wärmetönung von Enzymreaktionen. V. Über die Wärmetönung der Organautolyse 272

Nord, F. F. Biochemische Bildung von Aminoäthylalkohol aus Serin 281

Gonnermann, M. Der Eisengehalt der Öle, Fette, Wachsarten, Harze, Gummiharze, Gummiarten; sowie einige Analysen über den Gehalt an Kieselsäure und Tonerde 286

Einbeck, Hans. Über quantitative Versuche mit dem Succinicoxydon von Battelli und Stern 296

Leo, H. und **E. Rimbach.** Über die Wasserlöslichkeit des Camphers 306

Kögel, P. R. Über die Photosynthese des Formaldehyds und des Zuckers 313

Autorenverzeichnis 317

Ist die Milch altmelker Kühe als Säuglingsnahrung geeignet?

Von

F. E. Nottbohm.

(Mitteilung aus dem Staatlichen Hygienischen Institut zu Hamburg.)

(Eingegangen am 11. März 1919.)

Mit 4 Figuren im Text.

Wiederholt ist der Einfluß des Lactationsstadiums auf Zusammensetzung und Eigenschaften der Milch auf experimenteller Grundlage bearbeitet worden, so daß man im allgemeinen über die Veränderungen der Milch bei fortschreitender Lactation unterrichtet ist. Soweit die umfangreiche Literatur über diesen Gegenstand eingesehen werden konnte, finden sich aber gerade in bezug auf das Ende der Lactation, d. h. diejenige Zeit, in welcher nur noch sehr wenig Milch produziert wird, keine zusammenhängenden Angaben über die in diesem Stadium auftretenden weitgehenden Veränderungen. Wenn auch hin und wieder Abweichungen einzelner Milchbestandteile von der normalen Beschaffenheit einer Milch verzeichnet sind und sich vereinzelt schon Andeutungen finden, daß die letzte Milch sich nicht zur Verwendung als Kindermilch eignet, so ist doch eine eingehende Prüfung der Frage, ob die Milch, die gegen Ende der Lactation gewonnen wird, so weitgehende Abweichungen von der Beschaffenheit einer normalen Milch zeigt, daß sie als Säuglings- oder Vorzugsmilch nicht in den Verkehr gebracht werden sollte, offenbar noch nicht vorgenommen worden.

Während in sehr vielen Milchverordnungen, unter anderen auch in dem Hamburger Gesetz betreffend den Verkehr mit

Kuhmilch vom Jahre 1894 sich in bezug auf die gewöhnliche Handelsmilch die Vorschrift findet, daß „nach dem Abkalben gewonnene Milch so lange nicht in den Verkehr gebracht werden darf, als sie beim Kochen gerinnt“, ist, soweit ermittelt werden konnte, keine Vorschrift über Vorzugsmilch bekannt, die das Produkt des letzten Stadiums der Lactation als Vorzugsmilch ausschaltet. Der Entwurf einer Hamburger Verordnung über den Verkehr mit Kuhmilch stellt zwar unter III. Beschaffenheit der Milch, im § 8 die Anforderung, daß „von der Einfuhr in die Stadt Hamburg und vom Verkehr daselbst auszuschließen ist, Milch, die kurz vor oder in den ersten Tagen nach dem Abkalben gewonnen ist, solange sie beim Kochen gerinnt oder nach Aussehen, Geruch und Geschmack die Eigenschaften gewöhnlicher Milch nicht besitzt“. Hier soll offenbar nur die unmittelbar vor dem Kalben erzielte Milch betroffen werden, soweit sie nach leicht feststellbaren äußeren Eigenschaften keine verkehrsfähige Milch darstellt, also das Colostrum. Würde der Begriff „kurz vor dem Kalben“ so weit gefaßt werden, daß auch die Milch, die am Ende der Lactation erzielt wird, einbegriffen ist, so bliebe immer noch zu ihrer Ausschließung vom Verkehr die Forderung, daß sie in den angezogenen Eigenschaften von normaler Milch abweichen muß.

Soweit bis jetzt aber schon festgestellt werden konnte, besteht Grund für die Annahme, daß jede Milch gegen Ende der Lactation in ihrer chemischen Zusammensetzung weitgehende Abweichungen von gewöhnlicher Milch zeigt, ohne daß diese Eigenschaften äußerlich erkennbar sind.

Die für diese Ansicht bereits vorliegenden Unterlagen sollen nachstehend aufgeführt werden.

Es kann als bekannt vorausgesetzt werden, daß die einzelnen Milchbestandteile nicht unbeträchtlichen Schwankungen unterworfen sind. Wenn daher in diesen Ausführungen von einer Durchschnittsmilch gesprochen wird, so ist dies mit gewissem Vorbehalt zu verstehen, da eine Reihe von Ursachen, wie Rasse, Fütterung, Brunst, Melkzeit und andere mehr oder weniger erhebliche Abweichungen von dieser Normalmilch bedingen können.

Nachfolgend ist die Zusammensetzung einer Milch, die

nach den Untersuchungen von Bremer und Sponnagel[1]) und solchen, die im hiesigen Institut ausgeführt wurden, für das in der Umgegend Hamburgs vorherrschende Niederungsvieh als Durchschnittsmilch anzusehen ist, wiedergegeben und den von König[2]) angeführten Zahlen für die mittlere Zusammensetzung einer Frauenmilch gegenüber gestellt:

	Spez. Gew. bei 15°	Fett %	Fettfreie Trockensubstanz %	Stickstoffsubstanz in 100 ccm g	Milchzucker in 100 ccm g	Asche %
Kuhmilch . . .	1,0315	3,10	8,75	3,16	4,91	0,77
Frauenmilch . .	1,0298	3,74	8,68	2,01 (%)	6,37 (%)	0,30

Ein Vergleich der vorstehenden Zahlen zeigt deutlich, wie verschieden die beiden Milcharten ihrer chemischen Zusammensetzung nach sind. Die Kuhmilch übertrifft in erster Linie im Aschengehalt die Frauenmilch um das Doppelte; daneben ist sie auch erheblich reicher an Eiweißstoffen — ganz abgesehen von deren Zusammensetzung —, während umgekehrt ihr Gehalt an Milchzucker niedriger liegt als bei der Frauenmilch.

Um demnach in einfachster Weise die Kuhmilch in einigen wichtigen Punkten der natürlichen Nahrung des Säuglings ähnlich zu machen, verdünnt man sie zur Herabsetzung des Protein- und Aschengehaltes mit Wasser unter gleichzeitigem Zusatz von Milchzucker. Das dabei eintretende Herabdrücken des Fettgehaltes gleicht man im allgemeinen dadurch aus, daß man entsprechend mehr Milchzucker zusetzt, da 243 Teile Milchzucker 100 Teilen Fett isodynam sind.

Von einer alleinigen Verdünnung der Kuhmilch mit Wasser ist schon aus dem Grunde abzuraten, weil dadurch der osmotische Druck, der für Frauen- und Kuhmilch nahezu gleich ist, herabgesetzt würde. Eine Milchzuckerlösung von 11,5 % hat aber den gleichen osmotischen Druck wie Milch[3]).

Im allgemeinen kann somit unter der Annahme, daß die

---

[1]) Milchzeitung 38, 409, 1909.

[2]) Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel, 4. Aufl., 2, 598, 1904.

[3]) Jahrbuch für Kinderheilkunde 47, 389, 1898.

zur Verwendung gelangende Kuhmilch in ihrer Zusammensetzung keine erhebliche Schwankung zeigt, durch Zusatz einer bestimmten Menge Milchzuckerlösung ein annähernd gleichartiges Produkt erzielt werden.

Wie liegen aber die Verhältnisse, wenn als Ausgangsmaterial für die herzustellende Mischung eine Milch verwendet wird, die erst gegen Ende der Lactation gewonnen ist?

Da nach dieser Richtung hin eine größere Anzahl von Untersuchungen bisher nicht ausgeführt werden konnte, so muß zunächst versucht werden, diese Frage unter Zuhilfenahme der bereits vorliegenden Literaturangaben an der Hand der Zusammensetzung von drei gelegentlich entnommenen Milchproben altmelker Kühe zu beantworten.

Die bei den eigenen Untersuchungen ermittelten Zahlen sind in der nachfolgenden Zusammenstellung aufgeführt:

Kuh Nr.	Tag der Entnahme	Tägl. Milchmenge in l:	Spez. Gew. bei 15°	Fett %	Fettfreie Trockensubstanz %	Stickstoffsubstanz in 100 ccm	Milchzucker in 100 ccm g	Asche in 100 ccm g	Alkalität nach Farnsteiner in 100 ccm
1	16. V. 10	1	1,0343	4,70	9,78	—	—	0,83	+ 1,80
73	19. III. 14	1/2	1,0310	5,70	9,34	5,17	3,41	0,92	+ 2,18
165	19. III. 14	1	1,0350	8,00	11,46	7,25	3,06	1,20	+ 2,42

In allen drei Fällen handelt es sich um Tiere, die nur noch sehr wenig Milch lieferten und die deshalb nur noch einmal täglich gemolken wurden. Während die Milch der Kuh Nr. 1 im Haushalte verwertet wurde, kam diejenige von Nr. 73 und 165 in den Verkehr und zwar, da die betreffende Wirtschaft besondere Sauberkeit in der Aufstallung der Tiere und in der Behandlung der Milch vorsieht, als bevorzugte Milch.

Fett.

Sehen wir vom spezifischen Gewicht, das in zwei Fällen ungefähr mit demjenigen einer Zentrifugenmagermilch übereinstimmt, ab, so zeigt in erster Linie der Fettgehalt eine auffallende Höhe. Würde man die Milch der Kuh Nr. 165 nach

dem Fettgehalt beurteilen, so müßte man sie als Rahm ansprechen.

Es kann aber nicht gleichgültig sein, ob ein Säugling heute eine Milch mit einem Fettgehalt von 3,1 % bekommt und morgen eine solche mit einem Fettgehalt, der annähernd dreimal so hoch liegt. Man wird vielleicht den Einwand erheben wollen, daß derartige Fälle nur ganz vereinzelt vorkommen und daß die Höhe des Fettgehaltes einzelner Gemelke durch andere Milch ausgeglichen wird. Ich will aber vorweg bemerken, daß auf dem Gut, von dem die Proben der Kühe Nr. 73 und 165 kommen, die Kühe nach dem Milchertrag gefüttert und zu dem Zwecke auch entsprechend aufgestallt werden. So kommt es, daß sämtliche Kühe, die am Ende der Lactation sind, zusammenstehen und daß infolgedessen unter Umständen die Mischmilch ganzer Kannen nur von Tieren stammt, die am Ende der Lactation sind und deren Milch, wie später noch gezeigt wird, eine durchaus anormale Zusammensetzung aufweist. Hinzu kommt, daß das Abkalben in hiesiger Gegend in der Hauptsache in einem ziemlich eng begrenzten Zeitabschnitt erfolgt, so daß schon aus diesem Grunde allein die Möglichkeit besteht, daß zeitweilig die Milch ganzer Kannen nur von altmelken Kühen herrührt.

Ganz abgesehen von der außergewöhnlichen Höhe des Fettgehaltes, macht sich gegen Ende der Lactation aber auch eine tiefgehende Veränderung in der Beschaffenheit des Fettes bemerkbar.

Erst kürzlich hat von Fodor[1]) diese Veränderungen eingehend geprüft und sich hauptsächlich mit dem Säuregrad befaßt. Bekannt war bereits, daß die Menge der in Wasser löslichen flüchtigen Fettsäuren (R. M. Z.) während der Lactationsperiode allmählich sinkt, während die Jodzahl zunimmt.

Fodor fand zunächst, daß Butter in den Monaten, in denen das Abmelken vornehmlich stattfand, viel schneller verdirbt als zu anderen Zeiten des Jahres. Um die Ursache hierfür festzustellen, verbutterte er den Rahm der Milch von frisch- und altmelken Kühen. Die erhaltene Butter zeigte, wenn sie noch am Tage des Melkens gewonnen war, für beide

---

[1]) Diese Zeitschr. **26**, 235, 1913.

Arten ungefähr denselben Säuregrad. War die Butterung jedoch am Tage nach dem Melken vorgenommen, so übertraf die Butter von altmelken Kühen die andere im Säuregrad ganz erheblich. Fodor zieht auf Grund seiner Versuchsergebnisse den Schluß, daß das Milchfett der altmelken Kühe leichter zersetzbar ist als das der frischmelken. Die schnelle Veränderlichkeit des Fettes muß naturgemäß den Geschmack der Milch selbst bei kurzer Aufbewahrung schon nachteilig beeinflussen. Fortgeschrittene Lactation soll nach L. A. Rogers[1]) oft die Ursache eines ausgesprochen bitteren Geschmackes der Milch sein. Aus eigener Anschauung kann hierzu gesagt werden, daß die Milch der Kühe 73 und 165 am Tage nach der Probeentnahme bereits einen widerlich säuerlichen Geruch aufwies, so daß sie in diesem Zustande für den unmittelbaren Genuß untauglich war. Es ist anzunehmen, daß solche Milch schon unmittelbar nach dem Melken sich geschmacklich scharf von anderer Milch trennen läßt, eine Eigenschaft, auf die der Säugling sofort reagieren wird.

Fettfreie Trockensubstanz.

Der Jahresdurchschnitt an fettfreier Trockensubstanz betrug in den Jahren 1912 und 1913 für die Hamburger Marktmilch 8,83 bzw. 8,86 %, bewegt sich also in relativ engen Grenzen. Recht erhebliche Schwankungen zeigen dagegen die

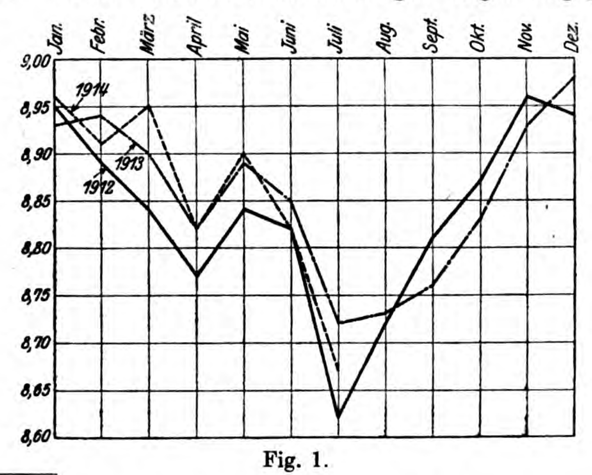


Fig. 1.

[1]) U. S. Dep. of. Agriculture. Farmers Bull. 490.

Durchschnittszahlen der einzelnen Monate, die der Übersicht halber in der beifolgenden graphischen Darstellung I zusammengestellt sind.

Um die Veränderungen in der Höhe der fettfreien Trockensubstanz noch anschaulicher zu machen, ist die Darstellung II so getroffen, daß hier nur diejenigen Milchproben, deren fettfreie Trockensubstanz über 9 $^0/_0$ und damit schon nicht unerheblich über dem Jahresdurchschnitt liegt, zu den gesamten untersuchten Proben in Beziehung gebracht sind.

Im allgemeinen läßt sich aus den Kurven I und II folgendes ersehen:

Vom Monat Juli an findet bis zum November ein gleichmäßig schnelles Ansteigen der Trockensubstanz statt, während sie dann im Frühjahr, abgesehen von einem plötzlichen Abfallen im Monat April, allmählich bis zum Juli wieder sinkt. Unter dem jeweiligen Jahresdurchschnitt an fettfreier Trockensubstanz sind, abgesehen vom Mai, die Monate April bis Oktober zu verzeichnen, von denen wieder der Monat Juli die am wenigsten gehaltreiche Milch liefert.

Auf welche Ursachen ist nun der hohe Durchschnitt an fettfreier Trockensubstanz in den Wintermonaten zurückzuführen?

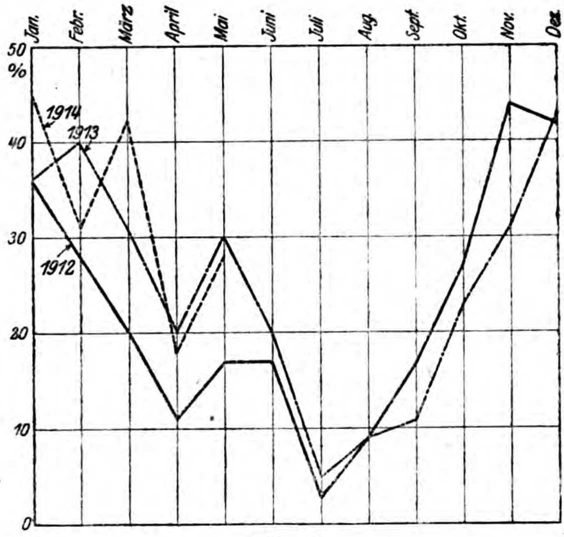


Fig. 2.

Die drei untersuchten Milchproben von altmelken Kühen liegen mit 9,34, 9,78 und 11,46 % fettfreier Trockensubstanz sehr weit über dem Durchschnitt. Wenn diese Werte sich auch lediglich auf Einzelgemelke beziehen, so zeigen die für einzelne Monate aufgeführten Höchstwerte (Darstellung II) doch, daß gleiche oder ähnliche außergewöhnliche Zustände auch bei der Hamburger Marktmilch anzutreffen sind. Es ist anzunehmen, daß, abgesehen von Einflüssen, die durch besondere Fütterungsverhältnisse — Übergang zur Trockenfütterung — und andere Umstände bedingt sind, der hohe Durchschnitt an fettfreier Trockensubstanz in den Wintermonaten mit darauf zurückzuführen ist, daß um diese Jahreszeit die Mehrzahl der Milchtiere kurz vor dem Kalben steht und in diesem Stadium Milch mit außergewöhnlich hoher fettfreier Trockensubstanz liefert.

Es muß aber für anormale Mengen an fettfreier Trockensubstanz in einer Kindermilch das gleiche gelten wie für außergewöhnlichen Fettgehalt, d. h. es kann nicht gleichgültig sein, ob ein Säugling einmal eine normal zusammengesetzte Milch mit einer fettfreien Trockensubstanz von ungefähr 8,75 % erhält und das andere Mal eine solche mit 9 bis 11 und mehr Prozenten.

Stickstoffsubstanz.

Die Kurven für den Gehalt der Milch an Trockensubstanz sind bis zu einem gewissen Grade abhängig von den Schwankungen der Milch im Eiweißgehalte. Es soll daher versucht werden, als Erklärung für das in allen drei Jahren sich bemerkbar machende Sinken der Trockensubstanz im Monat April — siehe Knickung der Kurven I und II — und für die auffallende Höhe an Trockensubstanz in den Wintermonaten gewisse im Verlaufe der Lactationsperiode regelmäßig auftretende Schwankungen im Eiweißgehalte heranzuziehen. Hierbei kann auf Versuche zurückgegriffen werden, die Eckleß und Shaw[1]) an einer Reihe von Milchtieren während des Verlaufs einer ganzen Lactationsperiode anstellten. Des besseren Vergleichs halber teilen sie die Lactationszeit nach Abzug der Colostralperiode und der Zeit kurz vor dem Versiegen der

[1]) U. S. Dep. of. Agriculture. Bureau of Animal Industry Bull. 155.

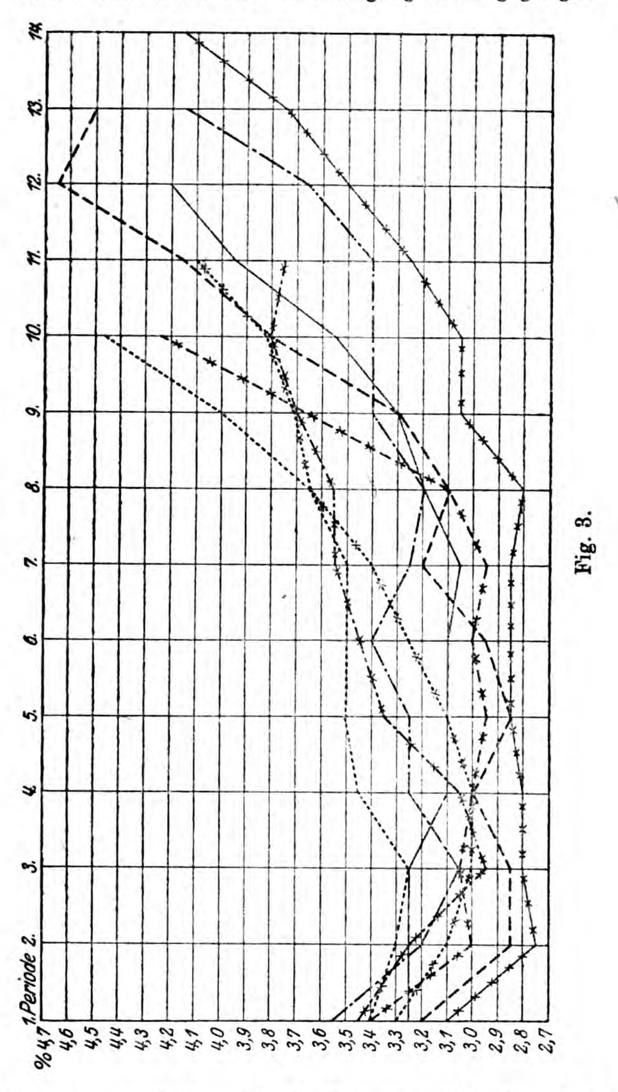


Fig. 3.

Milch in etwa vierwöchige Abschnitte ein und geben den wirklichen Durchschnittsgehalt an Stickstoffsubstanz für die Einzelabschnitte an.

In der Darstellung III sind die von den Verfassern in Zahlen angegebenen Werte aufgezeichnet. Die daraus sich ergebenden Linien zeigen die bemerkenswerte Tatsache, daß der Eiweißgehalt der Milch jedes einzelnen Versuchstieres unmittelbar nach der Colostralperiode nicht unbeträchtlich abnimmt,

um nach einigen Monaten, d. h. gegen Ende der Lactation weit über den anfänglichen Gehalt hinaus zu steigen.

Um das deutliche Sinken des Eiweißgehaltes am Anfang der Lactationsperiode noch anschaulicher zu machen, zeigt Darstellung IV den wöchentlichen Eiweißgehalt der Milch in den ersten sechs Wochen nach der Colostralperiode.

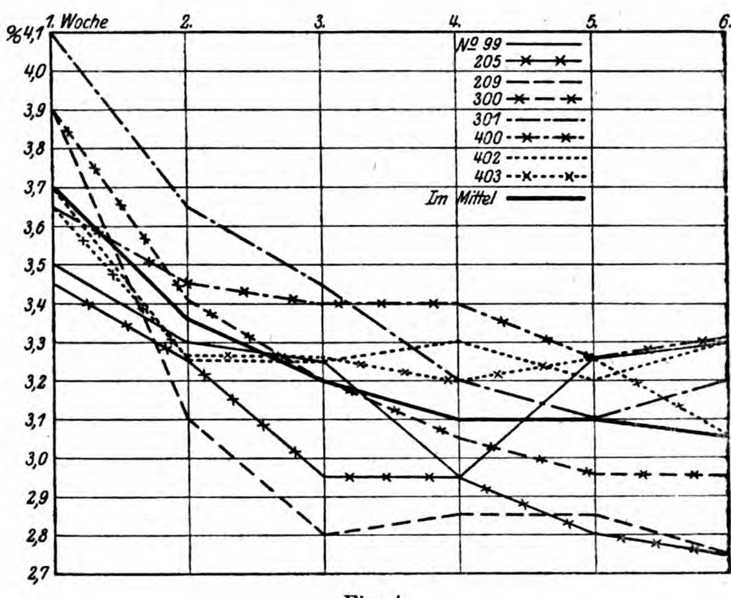


Fig. 4.

Überträgt man die Befunde der amerikanischen Forscher auf die hiesigen Verhältnisse, so kann, da die Zeit des Abkalbens hier hauptsächlich in die Wintermonate und zwar vorzugsweise in die Monate Februar und März fällt, dieser Umstand möglicherweise als Erklärung für das auffällige Sinken des durchschnittlichen Gehaltes an fettfreier Trockensubstanz im April herangezogen werden. Daß die hohen Trockensubstanzen der Wintermonate in erster Linie auf den zunehmenden Eiweißgehalt der Milch gegen Ende der Lactation zurückzuführen sind, läßt ein Blick auf die Darstellung III erkennen, wo von der 7. bis 8. Periode an sämtliche Kurven lebhaft ansteigen. Außerdem spricht für diese Anschauung neben eigenen Untersuchungen der hohe Prozentsatz von Milchproben

mit über 9 % fettfreier Trockensubstanz in den Wintermonaten.

Da bei den Versuchen von Eckleß und Shaw nach dem anfänglichen Sinken des Eiweißgehaltes dieser während der ganzen übrigen Lactationsperiode lediglich eine aufsteigende Tendenz zeigt und da die sonstigen für die Zusammensetzung der fettfreien Trockensubstanz in Frage kommenden Stoffe nur unerheblichen Schwankungen unterliegen, so bleibt dagegen der für Hamburg festgestellte Tiefstand der Trockensubstanz in den Sommermonaten zunächst unaufgeklärt. Möglich ist allerdings, daß der Übergang von der Stallfütterung zum Weidegang, der in hiesiger Gegend ungefähr in die Mitte des Monats Mai fällt, und die dann einsetzende ausschließliche Grasnahrung eine Herabsetzung des Eiweißgehaltes der Milch bedingen. Im vorliegenden Falle können jedoch für den Tiefstand der Trockensubstanz in den Sommermonaten noch andere Momente in Frage kommen, da die Berechnungen den durchschnittlichen Gehalt der Hamburger Marktproben darstellen. Gegebenenfalls wäre über die Ursachen der besprochenen Erscheinung durch Untersuchung der Milch von Viehstapeln, die ausschließlich Stallfütterung und solchen, die Weidegang haben, Klarheit zu schaffen.

Ist der höhere Proteingehalt einer normalen Kuhmilch gegenüber Frauenmilch schon ein maßgebender Faktor für ihre Beurteilung als Ersatz für Muttermilch, so wird er zu einer äußerst wichtigen Frage, wenn man annehmen muß, daß bei der Nahrung eines Säuglings von heute auf morgen eine Erhöhung des normalen Eiweißgehaltes um das Doppelte und mehr eintreten kann. Die drei untersuchten Proben sprechen jedenfalls für eine solche Möglichkeit. Bei Kuh Nr. 165 ist der Eiweißgehalt etwa 3- bis 4mal so hoch wie der einer normalen Frauenmilch.

Abgesehen von der beträchtlichen Zunahme der Proteinstoffe gegen Ende der Lactation muß auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die einzelnen Eiweißarten in ihrem Verhältnis zueinander gegenüber normaler Kuhmilch eine Veränderung erfahren haben.

Da a priori angenommen werden kann, daß durch eine plötzliche Überfütterung eines Säuglings mit Eiweiß Ver-

dauungsstörungen auftreten, so kann man zu der Ansicht kommen, daß in den Monaten, in denen sich die meisten Milchtiere am Ende der Lactation befinden, also im Spätherbst und im Winter, ein Ansteigen der Säuglingserkrankungen zu verzeichnen sein muß. Es erscheint deshalb nicht ausgeschlossen, daß Vergleiche auf Grund statistischer Unterlagen auch nach dieser Richtung hin Aufklärungen bringen können.

Milchzucker.

Der höhere Milchzuckergehalt der Frauenmilch gilt als wesentliches Unterscheidungsmerkmal gegenüber Kuhmilch. Nach den vorliegenden beiden Untersuchungen der Milch altmelker Kühe besteht Grund zu der Annahme, daß der Milchzuckergehalt im letzten Stadium der Laktation zurückgeht, so daß dadurch die Verwendung solcher Milch als Säuglingsnahrung noch mehr in Frage gestellt wird.

Daß man eine Milch, die in der letzten Zeit vor dem Versiegen gewonnen ist, infolge ihrer von normaler Milch abweichenden Zusammensetzung im allgemeinen schon durch die gewöhnliche Milchuntersuchung wird erkennen können, dürfte anzunehmen sein. Wie steht es aber, wenn eine Vermischung mit normaler Milch stattgefunden hat, oder wenn sich die Veränderungen noch nicht so stark bemerkbar machen, daß sie die nicht unbeträchtlichen üblichen Schwankungen in der Zusammensetzung gewöhnlicher Milch nicht übertreffen? In diesem Falle lassen sich mit Hilfe der allgemein üblichen Untersuchungsweise keine Anhaltspunkte für die Gegenwart von anormaler Milch finden. Man darf aber voraussetzen, daß sich mit Rücksicht auf die Entstehungsweise der Milch in der Zusammensetzung der Milchasche die Einflüsse der Lactation bereits zu einem Zeitpunkte zeigen werden, wo sie anderweitig noch nicht zu erkennen sind. Es erscheint daher angebracht, den einzelnen Aschenbestandteilen der Milch verschiedener Lactationsstadien ganz besondere Beachtung zu schenken.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Zusammensetzung einer Anzahl von Milchaschen wiedergegeben.

Zusammensetzung der Aschen von anscheinend normaler Milch.

	K_2O %	Na_2O %	CaO %	MgO %	P_2O_5 %	Cl %	Na_2O : K_2O [berechnet[1])]
Schrodt & Hansen[2]) a)	25,98	10,75	20,87	2,76	23,63	15,08	1 : 2,4
Schrodt & Hansen[2]) b)	24,98	11,07	21,88	2,37	24,48	14,24	1 : 2,3
König[3])	24,65	8,18	22,42	2,59	26,28	13,95	1 : 3,0
Kuh 655[4]) Pr. I .	25,51	5,58	25,48	2,82	28,83	11,34	1 : 4,6
Kuh 655[4]) Pr. II . .	25,10	5,32	25,53	2,77	30,16	10,58	1 : 4,7
Kuh 655[4]) Pr. III .	19,53	6,30	29,42	3,35	28,71	12,87	1 : 3,1
Kuh 674[4]) Pr. I . .	25,71	5,88	23,38	2,77	28,76	13,78	1 : 4,4
Kuh 674[4]) Pr. II . .	24,47	6,05	23,57	2,70	27,26	17,05	1 : 4,0
Kuh 674[4]) Pr. III .	20,31	10,34	22,93	2,98	25,58	20,23	1 : 2,0
Orla Jensen[5]) . . .	25,27	6,01	25,24	2,39	27,32	13,99	1 : 4,20
V. Storch[6])	24,74	9,71	21,44	2,42	28,05	13,36	1 : 2,55
Kuh 1	21,23	7,19	22,03	1,63	27,96	12,45	1 : 3,0
Kuh 2	24,07	5,75	20,56	2,25	27,00	14,79	1 : 4,2
Kuh 33	17,92	4,76	25,81	2,79	30,63	9,65	1 : 3,8

Schrodt & Hansen nahmen während der Monate Januar-September Aschenuntersuchungen in der Milch des Viehstapels der Versuchsstation Kiel vor. Hierbei war es ihnen in erster Linie darum zu tun, die Schwankungen festzustellen, die im Laufe der Lactationszeit auftraten. Die in der Tabelle wiedergegebenen Zahlen stellen die durchschnittliche Zusammensetzung der Asche dar, und zwar a) diejenige der aus Stallfütterung gewonnenen Milch, b) diejenige der aus Weidegang erzielten. Die von König angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus 16 Analysen.

Trunz untersuchte die Milchaschen von 2 Kühen während einer ganzen Lactationsperiode. Um die einzelnen Abschnitte derselben miteinander vergleichen zu können, teilte er sie in Perioden ein, die nach Abzug der sogenannten Colostrumperiode als Perioden I bis III in der Tabelle wiedergegeben sind.

---

[1]) Nicht Äquivalent!

[2]) Mitteilung a. d. milchw. Versuchsstat. zu Kiel; durch landw. Versuchsstat. **31**, 55, 1885.

[3]) König, Chemie d. menschl. Nahrungs- u. Genußmittel IV. Aufl., **2**, 603, 1904.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**, 263, 1903/04.

[5]) Molkereizeitung f. Berlin **14**, Nr. 44, 1904.

[6]) V. Storch, Analyse der Milch von tuberkulösen Kühen. Nach Maly, Jahresber. über die Fortschr. der Tierchem. **14**, 170, 1884.

Orla Jensen prüfte den Einfluß der Mineralbestandteile des Futters auf die Zusammensetzung der Milch. Die angegebenen Zahlen zeigen den Durchschnitt aus 15 Einzeluntersuchungen.

Storch wollte die Veränderungen der Milch bei Eutertuberkulose zeigen und stellt die gefundenen Werte solchen von gesunden Kühen aus Dänemark gegenüber.

Die Werte für die Einzelgemelke der Kühe 1, 2 und 33 sind im hiesigen Institut ermittelt und aus einer Arbeit über die Alkalität von Milchaschen herausgegriffen.

Zum Vergleich mit den obigen Werten ist in der nachfolgenden Übersicht eine Zusammenstellung der Aschenbestandteile von solcher Milch wiedergegeben, die ausschließlich von altmelken Kühen gewonnen wurde. Die Zahlen von Schrodt & Hansen stellen die mittlere Zusammensetzung von 3 Milchaschen dar, die aus Mischmilch von 2, 4 und 3 altmelken Kühen erhalten wurde.

	Asche in 100 ccm g	K_2O %	Na_2O %	CaO %	Mgo %	P_2O_5 %	Cl %	$Na_2O : K_2O$ (berechnet)
Kuh 73	0,92	12,78	16,22	23,30	2,87	19,41	21,30	1 : 0,8
Kuh 165	1,20	9,42	12,73	31,60	2,72	29,34	16,33	1 : 0,7
Trunz Kuh 674 . (letztes Gemelk) .	—	13,92	17,62	21,23	3,53	22,23	24,77	1 : 0,8
Schrodt & Hansen	—	20,61	16,15	20,97	2,75	22,18	17,63	1 : 1,3

Vergleich der Aschenbestandteile von normaler Milch und solcher, die von altmelken Kühen stammt.

In der Höhe des Aschengehaltes übertrifft die Milch altmelker Kühe in Einzelfällen die normale Milch mit einem Aschengehalte von etwa 0,77 % ganz erheblich, was insbesondere bei Kuh 165 hervortritt.

Stellt man die Einzelbestandteile der Aschen einander gegenüber, so fällt sofort eine völlige Verschiebung des Verhältnisses von Natron und Kali auf. Bei den Analysen von König, von Orla Jensen und auch bei den eigenen Aschenuntersuchungen normaler Einzelmilchproben überwiegt in allen Fällen das Kali ganz beträchtlich, und zwar verhalten sich Na_2O:

$K_2O = 1 : 3,0 - 4,2$. In ähnlichen Grenzen bewegen sich, wenn man von einer Ausnahme absieht, die Zahlen von Trunz.

Bei den Proben von Schrodt & Hansen und von Storch ist dagegen das Verhältnis bereits etwas verschoben, obgleich auch hier immer noch das Kali beträchtlich vorherrscht. Von den Proben b ist bekannt, daß sie von Kühen gewonnen sind, die den Höhepunkt der Lactation überschritten haben. Von den Proben a ist allerdings gesagt, daß sie aus einer Versuchsperiode stammen, in der sämtliche Tiere frischmelkend waren. Es ist also immerhin möglich, daß ein Heruntergehen des Verhältnisses $Na_2O : K_2O$ auf 1 : 2 noch zu den natürlichen Schwankungen einer normalen Milch gehört, oder man müßte annehmen, daß bei frischmilchenden Tieren der Kaligehalt der Milchasche niedriger liegt als gewöhnlich.

Kuh 674 Serie III, bei der sich Natron und Kali ebenfalls wie 1 : 2 verhält, kann hier aus einem später zu erwähnenden Grunde unberücksichtigt bleiben.

Verhältnis von Natron : Kali in der Milch altmelker Kühe.

Aus der Übersicht der Aschen altmelker Tiere ist zu entnehmen, daß in 3 Fällen, und zwar stets da, wo Einzelgemelke in Frage kommen, nicht mehr das Kali, sondern das Natron überwiegt.

Wenn bei den altmelken Kühen von Schrodt & Hansen (siehe Tabelle) noch ein geringer Überschuß von Kali vorhanden ist, so muß dabei berücksichtigt werden, daß die angeführte Asche die mittlere Zusammensetzung von 9 Einzelgemelken darstellt. Immerhin ist auch in diesem Falle das Verhältnis von Natron zu Kali gegenüber normaler Milch wesentlich verändert.

Untersuchungsbefunde, durch die eine Verschiebung der Alkalimengen in der Milchasche festgestellt wird, finden sich zwar in der Literatur, jedoch sind diese Beobachtungen nur auf vereinzelte Fälle beschränkt geblieben und haben offenbar keine Veranlassung gegeben, auf breiterer Grundlage Versuche anzustellen, um daraus allgemein gültige Schlußfolgerungen über die Beschaffenheit der Milch von altmelken Kühen zu ziehen.

Um den Kali-, Natron- und Chlorgehalt der Milch mit dem Gesamtorganismus der Säugetiere vergleichen zu können, unter-

suchte Bunge[1]) unter anderem die Aschen der Milch von 9 Kühen, die in der Lactation ungefähr gleich waren, auf ihren Gehalt an Alkalien: Er erhielt hierbei in der Milch von:

Kuh 1)	0,1748 K_2O	— 0,0678 Na_2O,	daraus berechnet sich $Na_2O : K_2O$	= 1 : 2,6
„ 2)	0,1716 „	— 0,0527 „	„ „ „ „	= 1 : 3,3
„ 3)	0,1769 „	— 0,0494 „	„ „ „ „	= 1 : 3,6
„ 4)	0,1834 „	— 0,0506 „	„ „ „ „	= 1 : 3,6
„ 5)	0,1865 „	— 0,0501 „	„ „ „ „	= 1 : 3,7
„ 6)	0,1904 „	— 0,0499 „	„ „ „ „	= 1 : 3,8
„ 7)	0,1879 „	— 0,0448 „	„ „ „ „	= 1 : 4,2
„ 8)	0,2125 „	— 0,0445 „	„ „ „ „	= 1 : 4,8
„ 9)	0,2137 „	— 0,0373 „	„ „ „ „	= 1 : 5,7

Bunge erwartete von vornherein einen um so größeren Kaliüberschuß, je reichlicher die Milchsekretion war, und fand dies auch insofern bestätigt, als die Kuh, deren Milchsekretion die spärlichste war, die natronreichste Milch lieferte und umgekehrt. Die mittleren Zahlen fügen sich allerdings diesem Gesetz nicht, weshalb Bunge meint, daß noch andere Faktoren gleichfalls von Einfluß auf den Alkaligehalt sind.

Die von Bunge angewendete Methode zur Bestimmung von Alkalien dürfte auch nach unseren heutigen Anschauungen als einwandfrei gelten, weshalb den von ihm ermittelten Zahlen Bedeutung beigelegt werden kann. Bemerkenswert ist, daß bei der Milch von Kuh 9 das Verhältnis von Natron : Kali sogar bis auf 1 : 5,7 steigt.

Bei einem anderen Versuche wollte Bunge den Einfluß der Kochsalzentziehung studieren. Er gab einem Tiere zunächst täglich 10 g Kochsalz, stellte dann die Darreichung von Salz vom 5. bis 10. Dez. ein und untersuchte die Milch am 19. Dez. Er erhielt:

0,1713 g K_2O und 0,1230 Na_2O, d. h. $Na_2O : K_2O = 1 : 1,4$.

Da das betreffende Tier bereits im April gekalbt hatte und nur noch relativ wenig Milch gab, dürfte diese Mitteilung von Bunge als Stütze für die eigenen Befunde herangezogen werden können.

Schrodt & Hansens Untersuchungsergebnisse bewegen sich ziemlich eindeutig in der gleichen Richtung. Auch diese Autoren meinen, daß von den Veränderungen gegen Ende der

[1]) Zeitschr. f. Biol. **10**, 295, 1874.

Lacatation vorzugsweise die Alkalien betroffen werden, da insbesondere das Mengenverhältnis des Natrons zum Kali ein ganz anderes wurde, als sie es sonst bei Aschen von normaler Milch beobachten konnten. Schrodt & Hansen glauben die Ursache für die Verminderung des Kaligehaltes in der nachlassenden Energie suchen zu müssen, mit welcher der Zerfall der Milchdrüsen erfolgt.

Trunz, der gleichfalls die prozentische Veränderung der Milchaschenbestandteile im Laufe der Lactation verfolgte, fand, daß bei 2 Versuchstieren der Kaligehalt in der Zeit der größten Milchsekretion mit 26,87 und und 29,63 $^0/_0$ den höchsten Stand erreichte, um dann zunächst langsam und in den beiden letzten Monaten rasch und zwar schließlich auf 16,89 und 13,92 $^0/_0$ zu fallen.

Der Natrongehalt der Asche von normaler Milch liegt, wie aus der Tabelle hervorgeht, zwischen 4,76 und 11,07 $^0/_0$. Der hohe Natrongehalt der Serie III von Kuh 674 wird lediglich durch den 17,62 $^0/_0$ betragenden Natrongehalt des letzten Gemelkes verursacht. Im übrigen findet Trunz während der ganzen Lactationszeit seiner beiden Versuchstiere nur einen Natrongehalt von 3,24 bis 8,56 $^0/_0$. Die von Orla Jensen untersuchten 15 Einzelaschen zeigen einen Natrongehalt von 5,39 bis 6,85 $^0/_0$ der Asche. Alle diese Befunde decken sich demnach mit den eigenen und lassen den Schluß zu, daß der Natrongehalt der Aschen von normaler Milch sich in ziemlich engen Grenzen bewegt.

Bei der Milch altmelker Kühe liegt nach den bisherigen Feststellungen der Natrongehalt der Asche zwischen 12,73 und 17,62 $^0/_0$, also ganz erheblich höher als bei normaler Milch.

Hinsichtlich des prozentischen Gehaltes der Milchasche an Kalk bewegten sich die für normale Milch und für solche von altmelken Kühen erhaltenen Zahlen ungefähr innerhalb gleicher Grenzen. Bei normaler Milch lag der Kalkgehalt der Asche zwischen 20,56 und 29,42 $^0/_0$. Wenn auch für den Kalkgehalt der Milch altmelker Kühe bisher nur wenige Untersuchungen herangezogen werden können, so zeigen die zwischen 20,97 und 31,60 $^0/_0$ liegenden Werte doch bereits, daß wesentliche Veränderungen durch das Fortschreiten der Lactation kaum zu erwarten sind. Erwähnt sei hier, daß bereits früher

in den Aschen von 20 Stallproben Kalkbestimmungen ausgeführt wurden, wobei allerdings hinsichtlich der Lactationszeit der Milchtiere keine besonderen Feststellungen getroffen werden konnten. Der Kalkgehalt schwankte damals zwischen 19,68 und 28,73 %.

Trunz fand bei Kuh Nr. 655 in den beiden letzten Monaten der Lactation eine ganz erhebliche Zunahme des Kalkgehaltes, während derselbe sich bei Kuh Nr. 674 bis zum Schluß in ganz normalen Grenzen hielt. Der Kalkgehalt des letzten Gemelkes der ersten Kuh mit 32,95 % geht allerdings noch über den diesseits ermittelten Höchstwert von 31,60 % hinaus.

Trunz zieht aus seinen Versuchen den Schluß, daß zwar das Casein mit fortschreitender Lactation eine bedeutende Zunahme erfährt, die nicht an Casein gebundene Kalkmenge jedoch nahezu die Gleiche bleibt, weshalb die Milch altmelker Kühe weniger intensiv auf Lab reagiert, als zur Zeit, wo der Caseingehalt niedriger ist.

Der Magnesiagehalt der Milchasche bewegt sich abgesehen von der Colostrumperiode für die übrige Lactationszeit in ungefähr gleichen Grenzen. Für normale Milch ergeben sich Werte von 1,63 bis 3,35 % und für Milch altmelker Kühe solche von 2,72 bis 3,53 %.

Der Gehalt an Phosphorsäure in der Asche von normaler Milch schwankt zwischen 24,48 und 30,63 %, während er bei Milch von altmelken Kühen zwischen 19,41 und 29,34 % liegt. Sieht man von der Kuh Nr. 165 mit 29,34 % P_2O_5 ab, so erreichen die übrigen 3 Proben noch nicht den niedrigsten Wert für normale Milch. Man kann demnach schließen, daß im allgemeinen der Phosphorsäuregehalt der Asche am Ende der Lactation tief liegt, daß aber vereinzelt Ausnahmen vorkommen. Durch diese Feststellung finden wahrscheinlich auch die in der Literatur vertretenen verschiedenartigen Anschauungen über den Phosphorsäuregehalt der Milch bei fortschreitender Lactation eine Erklärung.

Trunz glaubt sich in diesem Punkte im Gegensatz zu Schrodt & Hansen und zu Kort der von Andouard ausgesprochenen Erkenntnis anschließen zu müssen, daß der prozentische Phosphorsäuregehalt der Asche mit fortschreitender

Lactation sich bedeutend vermindere. Bei Kuh 674 findet er allerdings eine beträchtliche Verminderung des Phosphorsäuregehaltes. Dieser beträgt im letzten Gemelk nur 22,23 %; dagegen ist in der Milch von Kuh 655 ein in Betracht kommendes Heruntergehen des Phosphorsäuregehaltes nicht zu erkennen.

Auch hier werden sich entscheidende Feststellungen erst an der Hand eines größeren Materials treffen lassen.

Der Chlorgehalt der Asche normaler Milch liegt, wenn wir von Kuh 674, Serie III, absehen, zwischen 9,65 und 17,05 %, derjenige der Milch altmelker Kühe zwischen 16,33 und 24,77 %. Bereits Schulte-Bäuminghaus[1]) hat eine Steigerung im Chlorgehalt bei fortschreitender Lactation festgestellt. Trunz konnte allerdings nur in einem Fall, dann aber auch eine ganz beträchtliche Zunahme des Chlorgehaltes wahrnehmen, im anderen Falle hielt sich der Chlorgehalt ziemlich gleichmäßig während der ganzen Lactationsperiode.

Allem Anscheine nach ist gegen Ende der Lactationszeit mit einer Erhöhung des Chlorgehaltes zu rechnen; die aber womöglich erst in den letzten Gemelken deutlich zutage tritt.

Eine Veränderung innerhalb der Salze, insbesondere eine Zunahme des Natrium- und ein Zurücktreten des Kaliumgehaltes in der Milch altmelker Kühe ist insofern von weittragender Bedeutung, als die Salze der Milch in ernährungsphysiologischer Hinsicht eine große Rolle spielen. Sind sie es doch ausschließlich, aus denen der Säugling während eines beträchtlichen Zeitraumes das anorganische Material zur Blutbildung und zum Aufbau des Knochengerüstes entnimmt.

Nach Besprechung und Festlegung der Veränderungen, die in der prozentischen Zusammensetzung der Asche eintreten, wenn sich die Milchsekretion dem Ende zuneigt, soll noch kurz ein Vergleich gezogen werden mit der Asche einer Milch, die von einer mit eitriger Streptokokkenmastitis behafteten Kuh stammt.

---

[1]) Mitteilung der landw. Institute der Univ. Breslau, 2, 1; durch Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 295, 1902/3.

	K_2O %	Na_2O %	CaO %	MgO %	P_2O_5 %	Cl %	Na_2O : K_2O
Mittel aus den 4 Aschen altmelker Kühe	14,18	15,68	24,28	2,97	23,29	20,01	1:0,9
Kuh mit eitriger Streptokokken-mastitis	13,75	20,80	17,75	2,16	21,89	22,20	1: 0,7

Aus der weitgehenden Übereinstimmung der beiden Aschen geht hervor, daß alle charakteristischen Merkmale der Milchaschen altmelker Kühe sich auch bei Sekreten finden, die aus erkrankten Drüsen stammen. Das Verhältnis von Natron zu Kali ist gegenüber normaler Milch verschoben, der Phosphorsäuregehalt liegt tief, und der Chlorgehalt ist beträchtlich erhöht.

Es erscheint angebracht, an dieser Stelle auf die Untersuchung einer Milch von einem mit Eutertuberkulose behafteten Tiere hinzuweisen, die von Storch[1]) ausgeführt wurde. Er fand die Milch der kranken Drüse außerordentlich arm an Kalk und Phosphorsäure, während der Gehalt an Natrium stark vermehrt war. Aus seiner Analyse berechnet sich ein Verhältnis von Natron: Kali = 1 : 0,27. Beim Vergleich mit der Milch aus den gesunden Drüsen derselben Kuh stellt er fest, daß diese auffallend reich an Eiweiß ist. Die Zusammensetzung war folgende:

Fett	Eiweiß	Milch-zucker	Asche	Kali	Na-tron	CaO	MgO	P_2O_2	Cl	Na_2O : K_2O
6,50	5,89	3,39	1,01	13,27	22,39	24,67	3,43	25,42	0,19	1:0,6

Diese Milch paßt ihrer Zusammensetzung nach in allen Werten mit Ausnahme des Chlors zu den angeführten Milchproben von altmelken Kühen und ist mit ziemlicher Sicherheit als solche anzusprechen. Für den auffallend niedrigen Chlorgehalt fehlt allerdings jede Erklärung. Wenn Storch in der

[1]) l. c.

Milch gesunder Kühe einige Male dasselbe beobachtet haben will, so ist diese Erklärung mit Vorsicht aufzufassen, da eine derartige Beobachtung einzig dazustehen scheint.

Faßt man die Ergebnisse der vorliegenden Ausarbeitung zusammen, so ist als festgestellt anzusehen, daß die Milch altmelker Kühe sich in ihrer Zusammensetzung von normaler Milch so weitgehend unterscheidet, daß sie eine Sonderstellung einnimmt.

Zu einer ähnlichen Anschauung sind Bienert[1]) und Auzinger[2]) gekommen, aber auf anderem Wege. Bienert äußert auf Grund des Ausfalles der Labgärprobe die Ansicht, daß Milch von altmelken Kühen sich nicht zur Kinderernährung eignet.

Auzinger stellt die Forderung auf, daß als Kindermilch in keinem Falle Milch Verwendung finden darf, die bei der einfachen Alkoholprobe mit 70 Volumproz. Alkohol gerinnt. Da er an anderer Stelle darauf hinweist, daß unabhängig vom Säuregrad frische Einzelmilch nicht selten gerinnt, wenn sie von altmelken Kühen gegen Ende der Lactation stammt, wo der Säuregrad häufig erniedrigt ist, so will auch dieser Forscher schon einen Teil der Milch altmelker Kühe als Kindermilch ausschalten.

Die Anschauungen von Bienert und Auzinger finden durch die Feststellungen der vorliegenden Arbeit eine erhebliche Stütze. Darüber hinaus muß aber gleichfalls in Erwägung gezogen werden, ob Milch, die im letzten Stadium der Lactation gewonnen wird, nicht überhaupt vom Verkehr auszuschließen ist.

Vorerst dürfte es sich empfehlen, die aus dem bis heute zur Verfügung stehenden wenig umfangreichen Material unter Heranziehung der bereits vorliegenden Literaturangaben gefolgerten besonderen Eigenschaften der Sekrete altmelker Kühe durch eine größere Anzahl ähnlicher Untersuchungen nachzuprüfen. Zu dem Zwecke müßten, um möglichst alle durch Rasse, Fütterung usw. bedingten Schwankungen in der Zusammensetzung der Milch zu treffen, längere Zeit hindurch aus

[1]) Deutsche Milchwirtschaft in Wort und Bild **1914**, 31.
[2]) Molkerei-Zeitung Hildesheim 28, 458, 1914.

einer Reihe von Viehhaltungen verschiedenster Art Milchproben zur Untersuchung entnommen werden.

Nur so wird es unter Umständen möglich sein, nach gewissen Richtlinien den Zeitpunkt festzulegen, von dem an eine solche Milch nicht mehr als Vorzugsmilch oder überhaupt nicht mehr in Verkehr gebracht werden darf.

Vielleicht kann hierfür die Verschiebung des Verhältnisses der Alkalien zueinander als maßgebend herangezogen werden. Es bliebe noch nachzuweisen, ob das Zurücktreten des Kaliums allmählich vor sich geht, oder ob ein schneller Übergang zum Vorherrschen des Natriums führt. Feststellungen in dieser Richtung können uns vielleicht auch in der Frage, in welcher Weise die Milch innerhalb des Tierkörpers entsteht, einen Schritt weiter bringen.

Daß die Natronsalze in der Milch altmelker Kühe vor den Kalisalzen überwiegen, läßt den Schluß zu, daß zu diesem Zeitpunkt das Blutserum bei der Bildung des Sekretes eine weit größere Rolle spielt, bzw. seine Ausscheidungsprodukte mehr in die Erscheinung treten als zur Zeit normaler Milchsekretion.

Hinsichtlich des Verhältnisses von Natron : Kali zeigen die Milch altmelker Kühe, pathologische Milch bei Euterentzündungen (Mastitis und Tuberkulose) und Blutserum weitgehende Übereinstimmung. Nach Bunge[1]) und Abderhalden[2]) berechnet sich im Rinderblutserum Natron : Kali = 1 : 0,06.

Durch die Wirkung der in einer pathologischen Milch vorhandenen Blutflüssigkeit (Serum) wird die Gerinnung nach Labzusatz verhindert. Auf dieser Erscheinung fußt bekanntlich die sogenannte „Labhemmprobe" zur Diagnose der pathologischen Milch und der Euterentzündungen. Eine Milch, die von altmelken Kühen gewonnen ist, muß sich gegen Lab ganz ähnlich verhalten wie pathologische Milch. Für die Frage der Intensität der Labhemmprobe wäre es von Bedeutung zu wissen, ob die hemmende Wirkung erst eintritt, wenn die Natronsalze überwiegen oder schon beim Heruntersinken der Kaliumsalze.

---

[1]) Zeitschr. f. Biologie **12**, 191, 1876.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **23**, 511, 1897.

Durch die Verschiebung der Mengenverhältnisse der beiden Alkalien kann möglicherweise auch die Löslichkeit des Caseins beeinflußt werden.

Eine Nachprüfung der schon jetzt vorliegenden Befunde an möglichst reichem Material empfiehlt sich schon aus dem Grunde, weil das Zurückweisen der Milch altmelker Kühe vom Verkehr in bisher scheinbar überall bestehende Gewohnheiten eingreift und somit in wirtschaftlicher Hinsicht fühlbare Folgen haben kann.

In ernährungsphysiologischer Hinsicht aus den vorliegenden Befunden schon weitergehende Schlüsse zu ziehen, dürfte, so sehr die Ergebnisse dazu anregen können, verfrüht sein. Sowie aber die erforderlichen Nachprüfungen stattgefunden haben und die in der Arbeit festgelegten Befunde bestätigt sind, sollten klinische Versuche folgen.

Chinin und Hydrochinin im menschlichen Organismus. Verhalten des Chinins gegen rote Blutkörperchen.

Von

J. Halberkann.

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten zu Hamburg.)

(Eingegangen am 22. März 1919.)

Es ist eine schon längst bekannte Tatsache, daß das Chinin unter normalen physiologischen Bedingungen den menschlichen Organismus teilweise zu passieren vermag, der größere Teil hingegen eine Zerstörung erleidet, deren Verlauf und Produkte allerdings unbekannt sind. Da es vielen, die sich mit der Aufklärung dieses Zerfalles beschäftigt haben, nicht gelang, neben unverändertem Alkaloid ein Abbauprodukt zu finden, ist die Meinung allgemein geworden, daß der angegriffene Anteil restlos verbrannt wird, so daß die Endprodukte, Wasser, Kohlensäure und Ammoniak resp. einfache Bausteine aus diesen, als solche nicht in Erscheinung treten können. Eine so vollkommene, ohne Zwischenprodukte auslaufende Oxydation ist mit der sonst beobachteten Stabilität der beiden im Chininmolekül enthaltenen heterozyklischen Ringe, des Piperidin- und besonders des Chinolinkomplexes, schlecht in Einklang zu bringen, die auch in vitro sich gegen Oxydationsmittel recht beständig erweisen. Deshalb scheint mir eine völlige oxydative Aufspaltung doch nicht wahrscheinlich, obgleich auch ich mich bisher vergebens bemühte, Spaltstücke aufzufinden.

Das unverändert ausgeschiedene Alkaloid, dessen Menge normalerweise zwischen 15 bis 35 % schwankt, wird zur Hauptsache durch die Nieren eliminiert, nur ein geringer Bruchteil wird mit den Faeces ausgeschieden. So ergaben Gewichtsbe-

stimmungen in dem Stuhle eines Malarikers, der wunschgemäß täglich 2 g (4 mal 0,5 g) Chinin hydrochlor. per os erhalten hatte, an fünf aufeinander folgenden Tagen im Durchschnitt pro Tag 2,1 % des vereinnahmten Chinins. Mariani fand 2,67 %[1]), andere Untersucher [Kerner[2]), Merkel[3]), Schmitz[4]), Giemsa und Schaumann[5])] nichts bis Spuren, Flamini[6]), allerdings beim gerbsauren Chinin, in zwei Fällen 7,8 % und 14,8 %. An obigen fünf Kottagen enthielten die Harne 20,6, 16,7, 29,2, 31,6 und 30 % des eingenommenen Chinins. Die Höhe der Ausscheidung durch den Harn ist nicht abhängig von der Dauer der Einnahme [Prophylaxe und Medikation[7–14])] und eventuell eingeschobener Arsenbehandlung[15]), [16]), [8a u. b]), [13]), die bei drei Prüfungen[8b]) gleichmäßig am ersten Tage eine Senkung zu verursachen schien, die am zweiten Arsentage aber wieder ausgeglichen war. Die Schwankungen zeigen sich aber nicht nur bei verschiedenen Menschen, sondern auch bei dem gleichen Individuum, ohne Regel, von Tag zu Tag[17]), so daß eine Konstanz nicht eintritt. Wodurch dies bedingt wird, ist nicht klargestellt, jedoch spielen, abgesehen von Disposition, die Menge und Art der Nahrung, die Art der Chinineinverleibung und die Menge des Urins sicherlich dabei eine Rolle.

Daß das Harnchinin keine tiefgreifenden Veränderungen erfahren hat, ist schon längst wahrscheinlich gemacht worden, wenn sich auch neben diesem Chinin noch alkaloidartige Umwandlungsprodukte finden sollen, so das Dihydroxylchinin von Kerner[2]), identisch mit Skraups Chitenin[18]), ferner nach Merkel[3]) je eine Substanz basischen und sauren Charakters. Unter anderen schloß Personne[19]) aus den Formen der Salze und aus dem Drehungsvermögen des Sulfates, Schmitz[4]) aus den Eigenschaften und dem Säuregehalte des schwefelsauren Salzes, aus dem Wassergehalte des Platinates und dem Schmelzpunkte der Base, daß es sich nur um unverändertes Chinin handele. Giemsa und Schaumann[5]) prüften diese Angaben nach und fanden sie durch den Wassergehalt und durch die Schwefelsäurebestimmung des basischen Sulfates und gemäß des Schmelzpunktes der Base bestätigt und legten durch die Elementaranalyse der Base selbst das Resultat endgültig fest. Späterhin haben noch Nishi[15]) aus der Zusammensetzung des citronensauren Salzes, das aber nach Katz nicht konstant

zusammengesetzt sein soll, und aus dem Metallgehalte des Platinates und Katz[20]) aus dem Wasser- und dem Platingehalte des Doppelsalzes, ferner aus dem Jodgehalte des Herapathites geschlossen, daß es sich um unverändertes Chinin handele.

Im Verlaufe einer vor einiger Zeit mit Giemsa gemeinsam veröffentlichten Arbeit[21]) über China-Alkaloide wurde festgestellt, daß das basische Chininsulfat, das mit 8 Molekülen Wasser krystallisiert, die unter Verwitterung teilweise schon bei gewöhnlicher Temperatur an der Luft abgegeben werden, entgegen den Angaben in der Literatur über Schwefelsäure das Wasser nicht bis auf 2 Moleküle, sondern restlos abgibt, wenn auch die letzten Anteile nur langsam entweichen. Da infolge dieser Beobachtung eine gewisse Unsicherheit in die Ergebnisse von Giemsa und Schaumann[5]) getragen war, habe ich die Charakterisierung der Base nochmals durchgeführt.

Zur Isolierung der notwendigen Alkaloidmengen aus dem Harne bediente ich mich nicht des umständlichen direkten Ätherverfahrens, sondern ich habe, wenn auch mit Verlust, eine vorherige Konzentration der Base mittels Quecksilberjodid vorgenommen. Katz[20]) hält dessen Anwendung für untunlich, da er feine Suspensionen erhielt, die er weder durch Absetzen klären, noch filtrieren, noch auch durch längeres Zentrifugieren separieren konnte. In Wirklichkeit bereitet die Sammlung der Fällung keine Schwierigkeiten; man muß nur genügende Mengen der essigsauren Lösung des Kaliumquecksilberjodides zugeben, dessen Überschuß sich ja leicht aus den Filtraten zurückgewinnen läßt. Nach dem Absetzen im Eisschranke wurde die überstehende Flüssigkeit klar abgegossen und die aus ungefähr 100 l Harn gesammelten Niederschläge über Talkum filtriert und mit Essigsäure enthaltendem Wasser ausgewaschen. Zur Weiterverarbeitung hätte man nun in saurer Anschwemmung das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff entfernen und das Filtrat einengen oder nach Alkalisierung ausäthern können. Ersterer Weg ist nicht betretbar wegen der leichten Dissoziation des Jodwasserstoffes und der unvermeidlichen Einwirkung des Jodes auf die Basen; da deshalb doch geäthert werden muß, umgeht man die umständliche und unangenehme Abscheidung des Quecksilbers als Sulfid, nach einer Methode, die nachfolgend beschrieben ist und in manchen anderen Fällen,

in denen es sich um durch Quecksilberjodid fällbare, in Natronlauge unlösliche Substanzen handelt, ebenfalls gute Dienste leisten dürfte. — Übrigens hat Meyer ein ähnliches Verfahren vorgeschlagen, den entstandenen Quecksilberniederschlag mit alkalischem Zinnchlorür umzusetzen und die entstandene Flüssigkeit auszuäthern; jedoch bewährte sich Kerner[2]) diese Methode nicht.

Der vom Talkum zurückgehaltene Harnniederschlag wurde noch feucht mit Wasser angeschlemmt, in eine größere Stöpselflasche übergeführt, Natronlauge zugefügt und so lange mit Natriumsulfidlösung versetzt, bis das gebildete Quecksilbersulfid beim Schütteln mit hellbrauner Farbe in Lösung ging. Dann wurde von Talkum und Filterresten abgesaugt, der Rückstand ausgewaschen, getrocknet und mit Äther extrahiert. Dieser Ätherauszug wurde sofort zum Ausschütteln des mit Kochsalz versetzten Filtrates weiterverwandt. Nach dem Waschen und Trocknen der vereinigten Ätherauszüge wurde das Lösungsmittel verjagt, der Rückstand in wenig Alkohol gelöst, mit Schwefelsäure schwach kongosauer gemacht, die gleiche Menge Wasser zugesetzt und längere Zeit mit Tierkohle in der Wärme digeriert. Das fast alkoholfreie, schwachgelbe Filtrat wurde in der Siedehitze mit Soda gegen Lackmus neutralisiert und nach Zusatz von Talkum kochend heiß filtriert. Beim Erkalten schieden sich lange, wenig hellgrau gefärbte, teils in Büscheln angeordnete Nadeln ab, die genau wie basisches Chininsulfat aussehen. Nach nochmaligem Ausschütteln mit Äther und Wiederüberführung in das basische Sulfat waren die Krystalle völlig farblos, die zur Erzielung möglichst reiner Substanz durch Störung mikrokrystallinisch abgeschieden wurden.

Wie schon erwähnt, gibt das basische Chininsulfat über Schwefelsäure sein Krystallwasser völlig ab. Dieses entwässerte Sulfat nimmt jedoch an der Luft in kürzester Zeit genau 2 Moleküle Wasser wieder auf, ein Verhalten, das zur Kennzeichnung sehr geeignet ist[21]). Das oben isolierte Sulfat zeigte scharf dieses Verhalten: über Schwefelsäure erfolgte völlige Entwässerung, und das so oder durch Erhitzen wasserfrei gewonnene Sulfat nahm 2 Moleküle Wasser wieder auf.

0,7238 g über Schwefelsäure entwässertes Sulfat zogen nach 2^h 0,0341 g, nach 24^h 0,0352 g Wasser an.

0,8391 g bei 120° getrocknetes Sulfat zogen nach 2^h 0,0382 g, nach 24^h 0,0403 g Wasser an.

Für $(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2 \cdot SO_4H_2 \cdot 2\,H_2O$ (Mol.-Gew. 782,7)
berechnet 4,60 %,
gefunden nach 2^h 4,50 %, nach 24^h 4,64 % H_2O,
" " 2^h 4,35 %, " 24^h 4,58 % H_2O.

Der Gehalt an Schwefelsäure wurde gleichfalls stimmend gefunden.

0,3912 g wasserfreies Sulfat gaben 0,1240 g SO_4Ba.
0,4204 " " " " 0,1310 " SO_4Ba.

Für $(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2 \cdot SO_4H_2$ (Mol.-Gew. 746,7)
berechnet 13,14 %,
gefunden 13,31 % und 13,09 % SO_4H_2.

Zur ferneren Charakterisierung wurde über das chlorwasserstoffsaure Salz hinweg das Platindoppelsalz bereitet, dessen Wassergehalt und Elementaranalyse eindeutig für Chinin sprechen.

0,4673 g Platindoppelsalz verloren 0,0102 g an Gewicht. — 0,1660 g lufttrockenes Platindoppelsalz gaben 0,1935 g CO_2, 0,0594 g H_2O, 0,0431 g Pt. — 0,1757 g Doppelsalz lieferten 0,2006 g AgCl.

Für $C_{20}H_{24}O_2N_2 \cdot PtCl_6H_2 \cdot H_2O$ (Mol.-Gew. 752,3)
berechnet H_2O 2,40 %, C 31,91 %, H 3,75 %, Pt 25,95 %, Cl 28,28,
gefunden H_2O 2,18 %, C 31,80 %, H 4,00 %, Pt 25,96 %, Cl 28,24.

Die Base selbst zeigte in 1,5172 volumprozentiger, absolut alkoholischer Lösung im 200 mm-Rohr bei 20° eine Drehung von — 5,06°, demnach ist $\alpha_D^{20°} = -166{,}7°$. Diese Drehung stimmt mit der in der Literatur angegebenen spezifischen Drehung für Chinin überein, die nach Oudemans[22]) — 164,7° bis — 169,8° (bei 0,4° bis 17°), nach Hesse[23]) — 169,25° bis — 170,5° und nach Rabe[24]) — 158,2° und — 158,7° (bei 15° resp. 20°) beträgt.

Nach allen diesen Befunden, in Beihalt der qualitativen Prüfungen (leichte Oxydierbarkeit durch Kaliumpermanganat in

schwefelsaurer Lösung, Fluorescenz, Thalleiochinprobe, Schmelzpunkt der Base) ist festgestellt, daß das nach obiger Methode aus dem Harn nach Chinineinnahme isolierte Alkaloid unverändertes Chinin ist.

Wenn es auch unwahrscheinlich, jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen schien, daß das Chinin im Organismus teilweise reduziert würde, wobei Hydrochinin (das neben Chinin in der Chinarinde vorkommt) gebildet werden könnte, wurde die Mutterlauge des Chininsulfates daraufhin geprüft. Das darin enthaltene Alkaloid wurde jedoch bei 0^0 in kurzer Zeit durch Kaliumpermanganat restlos zerstört, so daß das Vorhandensein des beständigeren Hydrochinins ausgeschlossen ist.

Die Isolierung des Chinins aus dem Harne wurde noch auf einem anderen Wege durchgeführt, der jedoch der Quecksilberisolierung gegenüber keine Vorteile aufwies, nämlich durch Adsorption an Kohle. Der Harn wurde durch 200 g Tierkohle filtriert, die gemäß der Prüfung des Ablaufes mit HgJ_2 das Alkaloid vollkommen band. Bei 50 l Harn mußte die Perkolation wegen Verschleimung des Filters unterbrochen werden; es ist jedoch nicht zweifelhaft, daß bei Zusatz von Toluol noch vielmals mehr Harn die Kohle mit Erfolg hätte durchfließen können. Die mit Wasser gewaschene Kohle wurde mit schwefelsäurehaltigem Alkohol wiederholt ausgekocht, die Auszüge fast neutralisiert, der Alkohol verjagt, und dem Rückstande nach Zusatz von Natronlauge das Alkaloid durch Äther entzogen. Nach Reinigung des Ätherextraktes durch Kochen mit Kohle und Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat hinterließ das Filtrat einen bräunlichen Firnis, der bei 138^0 schmolz. Chinin besitzt den Schmelzpunkt 177^0, jedoch genügen geringe Verunreinigungen, um denselben außerordentlich herabzudrücken. 1,298 g verbrauchten zur Neutralisation gegen Lackmus 3,9 ccm n-Schwefelsäure; für Chinin berechnet sich 4,0 ccm. Das erhaltene gereinigte Sulfat gab die Chininreaktionen, krystallisierte wie dessen Sulfat und enthielt 13,08 $^0/_0$ SO_4H_2, berechnet 13,14 $^0/_0$.

Beim Ausschütteln des Chinins mit Äther verblieb noch Alkaloid in der laugischen Flüssigkeit, das nach dem Ansäuern und folgendem Alkalisieren mit Soda jetzt in Äther überging. Nach zweckentsprechender Reinigung schmolz die firnisartige

Base bei 120° unter Aufschäumen, zeigte in salpetersaurer Lösung schwach blaue Fluorescenz (vielleicht von Chininspuren herrührend) und gab nur schwache Thalleiochinreaktion. 0,4721 g benötigten zur Neutralisation gegen Lackmus 12,0 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure, wohingegen sich für Chinin 13,2 ccm berechnen würden, und das gereinigte Sulfat krystallisierte in Drusen farbloser, derber Nädelchen, andersartig als wie Chininsulfat. Die geringe Menge der Base wurde nochmals in Natronlauge gelöst und nach Reinigung der Lösung mit Äther, Ansäuern und Alkalischmachen mit Soda in Äther aufgenommen. Der zurückbleibende, fast farblose Firnis wurde zerrieben und über Schwefelsäure getrocknet.

0,0886 g Substanz gaben 0,2175 g CO_2 und
0,0543 g H_2O, gefunden . . . . . . C 66,97 und H 6,86,
während sich für Chinin berechnet (das aber
nicht in Betracht kommt) . . . . . „ 74,03 „ „ 7,46,
und für Cuprein, das Phenol des Chinins „ 73,48 „ „ 7,14.

Die geringe Menge der Substanz, die leider teilweise noch in Verlust geriet, ließ eine Aufklärung nicht zu. Zu irgendeiner Deutung berechtigen die geringen Resultate nicht, und sie muß deshalb späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Ob es sich um eine Einführung des Glykokollrestes — $NHCH_2COOH$ in das Chininmolekül handelt, möge nur als Hypothese ausgesprochen werden. Eine solche Substanz, die 66,31 % Kohlenstoff und 7,09 % Wasserstoff enthalten würde, sollte allerdings a priori in Soda löslich sein. Daß die Base nachträglich aus Chinin durch Bakterientätigkeit in der Kohle entstanden ist, ist nicht anzunehmen, da die Harnbakterien das Chinin nicht verändern, eher käme eine Oxydation durch die Kohle als Katalysator in Frage, obwohl dies in dem Medium unwahrscheinlich dünkt. Einige Versuche, in denen je 400 ccm Normalharn 0,03 g Chininbase als salzsaures Salz zugefügt worden waren und die bis 6 Monate in offenen Kolben bei Zimmertemperatur standen, ergaben, daß das Chinin bei der Fäulnis des Harnes nicht verändert wird. Die Proben zeigten bald starke, ammoniakalische Gärung, und es schied sich in den länger stehenden Proben Ammonium-Magnesiumphosphat in großen Krystallen ab.

Nummer	Isoliert nach	gewogen g	%
Kontrolle	—	0,0002	0,7
1	8 Tagen	0,0308	102,7
2	3 Wochen	0,0302	100,7
3	2 Monaten	0,0295	98,0
4	6 „	0,0303	101,0

Eine Zerstörung oder Veränderung des Chinins fand nicht statt; alle Rückstände waren farblose Firnisse, zeigten angenährte Schmelzpunkte und gaben die Identitätsreaktionen. Danach braucht man sich mit der Chininisolierung gar nicht zu beeilen, und nach Feststellung des Gewichtes bzw. des Volumens des Harnes kann man sie auf eine arbeitsfreiere Zeit verschieben, oder, wenn eine Untersuchung an Ort und Stelle nicht möglich ist, kann man die Proben ohne Zusatz eines Erhaltungsmittels verschicken, ohne das Ergebnis zu gefährden.

Eine Entgiftung des Chinins im Organismus durch Überführung in eine gepaarte Schwefelsäure oder in eine glykuronsaure Verbindung, was gleichzeitig, ohne Vorbehandlung, einen Minderbefund an Alkaloid bei der Ausätherung des alkalisierten Harnes bedingen würde, konnte nicht festgestellt werden. Die chininhaltigen Harne (verschiedener Malariker), deren Glykuronsäuregehalt nicht übermäßig war, wurden nach Zusatz von 1,25 % Salzsäuregas eine Stunde in kochendem Wasserbade erhitzt und dann in ihnen und in nicht behandelten Proben das Chinin bestimmt. Je 400 ccm wurden angewandt.

Nummer	Nicht behandelt g	+ HCl erhitzt g
1	0,0101	0,0098
2	0,0231	0,0228
3	0,0136	0,0130
4	0,0185	0,0185

Für eine Entgiftung in obigem Sinne hat sich demnach kein Anhalt ergeben, da vor und nach der Behandlung die gleiche Menge gefunden ward.

Ähnlich oder gleich dem Chinin verhält sich auch das Hydrochinin im menschlichen Organismus. Dieses Alkaloid ist ein steter Begleiter des Chinins in der Chinarinde, findet sich allerdings nur in untergeordnetem Maße. Die Isolierung aus

den Mutterlaugen des Chinins ist begründet auf die größere Widerstandsfähigkeit gegenüber Kaliumpermanganat, weil die so leicht der Oxydation unterliegende Vinylgruppe in die Äthylgruppe umgewandelt ist. Dieses Hydrochinin kann nun nach der Paalschen Methode, durch Reduktion in alkoholischer Lösung bei Anwesenheit eines Edelmetall-Katalysators, oder nach Kelber[25]) durch Reduktion der Salze des Chinins in wäßriger Lösung bei Gegenwart von Nickel-Katalysator mittels Wasserstoff quantitativ dargestellt werden, was wichtig ist, weil es gegen die Malariaparasiten in geringeren Dosen die gleiche Wirkung wie sein Isologes entfaltet[26]).

Anschließend an die Publikation von Giemsa und Werner[26]) ergaben Selbstversuche, daß die Ausscheidung durch den Harn in die Chininintervalle fällt. Es wurden an einem Tage je 2 mal 0,5 g des salzsauren Salzes in Oblaten genommen, der Harn von 2 Tagen gesammelt; dann blieb die Quecksilberreaktion aus, so daß nur noch eine geringe Nachausscheidung anzunehmen ist, die allerdings mit der äußerst empfindlichen Fluorescenzprobe bis zum sechsten Tage sicher verfolgt wurde. Es möge erwähnt werden, weil auf Grund der Fällungs- und Trübungsintensitäten mit HgJ_2 quantitative Ausmittelungen ausgeführt worden sind, die als völlig unhaltbar nachgewiesen wurden, daß die einzelnen Harnproben des einen mit HgJ_2 keine Niederschläge, sondern nur mehr oder minder starke Trübungen gaben, dagegen in den anderen Harnen bei vielen Proben sofort Fällungen auftraten, was ganz unterschiedliche Mengen anzuzeigen schien, während tatsächlich die gewichtsanalytische Bestimmung fast gleiche Gehalte ergab. Angewandt wurden je 400 ccm Harn: in dem einen 4380 ccm betragenden Harn fanden sich 0,1774 g, in dem andern 4250 ccm Harn 0,1721 g Base, das ergibt eine Ausscheidung von 21,6 % und 21,0 %.

Diese Befunde stehen nicht im Einklange mit der Angabe bei Giemsa und Werner, die in einem Falle fanden, daß im Harn nahezu 70 % des Hydrochinins eliminiert werden, und die darauf die energischere Wirkung gegenüber Chinin zurückführten — in der Annahme, daß nur das unveränderte Alkaloid zur Entfaltung seiner Wirksamkeit gelangt —, da letzteres wegen der Vinylgruppe eine geringere Widerstandskraft

gegenüber der destruktiven Tendenz der Körperzellen habe. Wegen der wenigen Untersuchungen muß gelegentlich eine Nachprüfung erfolgen.

Giemsa und Werner[25]) machten schon wahrscheinlich, daß die isolierte Base, von der ihnen für eine Elementaranalyse nicht genügend Substanz zur Verfügung stand, unverändertes Hydrochinin sei, da der Schmelzpunkt, die Krystallform des basischen Sulfates, die Widerstandsfähigkeit gegen Kaliumpermanganat und andere Eigenschaften dafür sprachen. Daß es sich in der Tat um Hydrochinin handelt, wird durch folgende Untersuchungen festgelegt.

Eine größere Menge Harn von Malarikern, die pro Tag 1 g salzsaures Hydrochinin erhielten, wurde wie bei Chininharn angegeben mit HgJ_2 versetzt, wobei sich in der Farbe der Niederschläge der Unterschied zeigte, daß, während sich bei Chinin ein rötlichweißer Niederschlag bildete, der bei Hydrochinin grauweiße Farbe besaß. Die Weiterverarbeitung geschah, wie beschrieben, und aus der schließlich erhaltenen Rohbase, ein hellbrauner Firnis, wurde das völlig farblose, in langen, spießigen Nadeln krystallisierende, basische Sulfat bereitet. Dieses gibt, ebenso wie das Chininsulfat, über Schwefelsäure sämtliches Krystallwasser ab, nimmt aber an der Luft, im Gegensatze zu diesem, das nur 2 Moleküle Wasser anzieht, 4 Moleküle Wasser, in etwas längerer Zeit und nicht mit der gleichen Konstanz auf[21]).

0,4428 g entwässertes Sulfat nahmen nach 24^h 0,0404 g Wasser auf. — 0,6707 g Substanz nach 24^h 0,0579 g, nach 48^h 0,0626 g. — 0,4433 g Substanz nach 24^h 0,0435 g, nach 48^h 0,0448 g.

Für $(C_{20}H_{26}O_2N_2)_2 \cdot SO_4H_2 \cdot 4\,H_2O$ (Mol.-Gew. 822,7) berechnet: 8,76 % H_2O; gefunden: 8,36 %, 7,95 resp. 8,54 %, 8,94 % resp. 9,18 %.

0,3376 g wasserfreies Sulfat lieferten 0,1040 g SO_4Ba.

Für $(C_{20}H_{26}O_2N_2)_2 \cdot SO_4H_2$ (Mol.-Gew. 750,7) berechnet 13,07 %; gefunden: 12,95 % SO_4H_2.

Die Elementaranalyse des über das salzsaure Salz weg hergestellten Platindoppelsalzes[27]) zeitigte folgendes Ergebnis.

0,1497 g Substanz verloren im Vakuum bei 95° 0,0066 g

an Gewicht und gaben 0,1710 g CO_2, 0,0507 g H_2O und 0,0376 g Pt. — 0,1657 g Substanz geben 0,1839 g AgCl.

Für $C_{20}H_{26}O_2N_2 \cdot PtCl_6H_2 \cdot 2\,H_2O$ (Mol.-Gew. 772,4) berechnet: H_2O 4,67 %, H 3,65 %, C 31,09 %, Pt 25,27 %, Cl 27,55 %; gefunden: H_2O 4,40 %, H 3,79 %, C 31,16 %, Pt 25,12 %, Cl 27,46 %.

Die bei 125° getrocknete Base drehte in 1,7292 volumprozentiger Lösung in 96 %igem Alkohol im 200 mm-Rohr bei 20° — 4,92°, demnach beträgt $\alpha_D^{20°} = -142,3°$; nach Beilstein, Handbuch der organischen Chemie 3, 859, ist die spezifische Drehung einer 2,4 volumprozentigen Lösung in 95 %igem Alkohol bei 20° — 142,2° [27]).

Die Lösung von 0,05 g des Sulfats in 10 ccm Wasser und 5 Tropfen verdünnter Schwefelsäure reduzierte nach Zusatz eines Tropfens gesättigter Kaliumpermanganatlösung dieses nicht sofort, sondern erst nach einigem Stehen.

Diese Ergebnisse nebst den qualitativen Eigenschaften der Base beweisen, daß das Hydrochinin, soweit es durch den Harn ausgeschieden wird, beim Durchgang durch den menschlichen Körper nicht verändert wird. Daß auch keine teilweise Veränderung stattgefunden hat, ergab die Prüfung des letzten, aus den Mutterlaugen isolierten Anteiles, der sich gegen Permanganat ebenfalls beständig erwies.

Von einer größeren Anzahl von Forschern ist festgestellt worden, daß das Chinin, wie es auch dem Körper einverleibt werde, selbt nach intravenöser Injektion, nur eine kurze Zeit im zirkulierenden Blute nachzuweisen ist, und daß es nach einigen Stunden daraus völlig verschwinde, während es noch lange hernach mit dem Harn ausgeschieden wird. Daraus wurde gefolgert, daß es von gewissen Organen oder Zellkomplexen abgefangen und deponiert werde, und von dort aus allmählich freigegeben werde oder der Vernichtung anheimfalle. So fanden Giemsa und Schaumann [5]), die sich als erste mit diesem Problem beschäftigten, nach Verfütterung an Hunde per os nur sehr geringe Mengen Chinin im Blute, und zwar im Serum, nicht in den Blutkörperchen und folgern, sofern sie einen Schluß für zulässig halten, daß das Serum alles Chinin

oder doch die Hauptmenge enthalte. Größere, wenn auch nicht wägbare Mengen stellten sie und nachher noch Giemsa[28]) im Gehirn, Niere, Nebenniere, Milz und Leber fest, weshalb es wahrscheinlich sei, daß die Abtötung der Parasiten vorzugsweise in diesen Organen stattfinde. A. Plehn[29]) bestätigte die Blutbefunde beim Kaninchen und Hunde und macht es höchstwahrscheinlich, nachdem er mit Großer[30]) das Verschwinden von 55 bis 75 $^0/_0$ Chinin in der künstlich durchbluteten Leber beobachtet hatte, daß das periphere Gefäßsystem resp. die Endothelauskleidung seines Capillargebietes an der fast sofortigen Arretierung des in die Blutbahn eingeführten Chinins beteiligt ist.

Bei dem Nachweise des Chinins im Blute ist es nicht richtig, das Fibrin abzuscheiden, das zwar an sich, wie ich mit Schweineblutfibrin prüfte, kein Chinin zu binden imstande ist, dieses jedoch mechanisch mitzureißen vermag, ein Fehler, der bei den geringen Alkaloidmengen wohl ins Gewicht fallen könnte. Großer vermeidet diesen Fehler, indem er das Fibrin nach langwieriger Vorbereitung mit Chloroform extrahiert, also zwei Extraktionen vornehmen muß, was zu umgehen ist. Das eben entnommene Blut verreibt man im Mörser sofort mit 15 $^0/_0$iger Natronlauge (30 ccm auf 100 ccm Blut), verdünnt die homogene Masse mit der gleichen Menge Wasser, gießt in einen Scheidetrichter, spült den Mörser portionsweise mit derselben Menge Wasser, dann einigemale mit Äther und schüttelt nach völliger Auflösung des Blutes wiederholt mit Äther aus. Die getrockneten Ätherextrakte werden mit $^n/_{10}$- oder $^n/_{100}$-Salzsäure einigemale geschüttelt, der saure Auszug mit Äther gereinigt, dann das Alkaloid nach Zufügen von Ammoniak oder Natronlauge in Äther aufgenommen. Der Äther wird entwässert, und dessen Rückstand bei 120° im gewogenen Kolben getrocknet. Wägbare Mengen wird man zwar in praxi nicht finden, jedoch arbeitet die Methode quantitativ. So erhielt ich aus 50 ccm Rinderblut (erste Ätherauszüge durch Lipochromgehalt stark gelb gefärbt), dem 0,041 g Chinin zugesetzt war, 0,0401 g = 98,2 $^0/_0$ zurück, eine Kontrolle mit gleich viel Blut gab einen Rückstand von $^1/_{10}$ mg. Eine andere Probe, mit Kaliumbioxalat ungerinnbar gemachten Schweineblutes (50 ccm) wurde mit 0,082 g Chinin = 0,1 g salzsaures Salz versetzt, die berechnete Menge Chlorcalcium zugefügt, durch Rühren das

Fibrin abgeschieden und dieses mit 100 ccm Wasser sorgfältig ausgewaschen. Die Blutflüssigkeit und das Fibrin wurden getrennt in Natronlauge gelöst und wie oben weiterbehandelt. Das defibrinierte Blut ergab 0,0758 g Chinin = 92,8 % und das Fibrin, trotz sorgfältigen Auswaschens noch 0,0048 g = 5,9 %; zurückgewonnen 98,7 %.

Die Folgerung aus den Blutbefunden von Giemsa und Schaumann teilte Nocht[31]) nicht, der durch seine Experimente zu der Ansicht gelangt war, daß das Chinin seine Wirkung innerhalb der roten Blutkörperchen entfalte. Die Ergebnisse seiner im Jahre 1900 angestellten Versuche, die er bei den Verhandlungen des deutschen Kolonialkongresses 1905 in seinem Vortrage: Über Schwarzwasserfieber bekanntgab, waren in folgender, kurz skizzierter Anordnung gewonnen. Wurde weniger als die hämolytische Chinindosis — das sind 2 mg — 5 ccm einer 10 %igen Aufschwemmung defibrinierten Menschenblutes in physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt, und nach einigem Stehen bei 37° das durch Zentrifugieren erhaltene Serum wieder mit so viel Chininlösung und Blutkörperchen versetzt, daß für obige Aufschwemmung die totalhämolysierende Chinindosis erreicht oder gar etwas überschritten war, so erfolgte keine Hämolyse. Aus diesem Verhalten blieb nur den Schluß zu ziehen übrig, daß im ersten Teile der Versuche die Blutkörperchen einen größeren Teil des Chinins gebunden hatten.

In einer vor einiger Zeit erfolgten Veröffentlichung stellt Morgenroth[33]) fest, daß das Chinin, ebenso wie Optochin von den Erythrocyten nicht nur aufgenommen, sondern sogar in erheblichem Maße gespeichert werde; er zeigte dies vorher schon durch Anästhesierung der Kaninchencornea, die mit einem mit Optochin behandelten Blutkörperchenbrei (nach dem Zentrifugieren) alsbald eintrat, während der Abguß nur undeutlich reagierte. Ebenso verhielt sich Chinin, und Morgenroth bezeichnet dieses Beladen und Wiederabgeben an andere Zellen als Transgression. Diese Speicherung scheint nur ein physikalischer Vorgang zu sein, ist jedenfalls so labil, daß die beladenen Blutkörperchen mit Kochsalz- oder Rohrzuckerlösung geschüttelt einen Teil des Alkaloids an die Verdünnungsflüssigkeit abgeben. Aus den Versuchen folgert Morgenroth, daß bei einer Verdünnung 1 : 100000 Vollblut Mengen, die sich

um 50 % herum bewegen, — ob 75 % oder 25 % bleibt unentschieden — in Verlust gegangen sind.

Eindeutig scheinen die Folgerungen nicht zu sein, wie auch in einer Fußnote hervorgehoben wird, da bei der Einwirkung auf Pneumokokken (Versuche Boeckers) ebenso in den Anästhesierungsversuchen eine Transgression, bei den eigenen Pneumokokkenversuchen aber nicht oder weniger in Erscheinung tritt.

Seine Beobachtungen führten Morgenroth zu der Annahme, daß die geringe Chininkonzentration im ganzen Blute zur Abtötung der Plasmodien nicht genüge, und daß erst durch die Speicherung in den roten Blutkörperchen die Wirkung des Chinins verständlich werde. Die chininbeladenen Erythrocyten hindern die Merozoiten bzw. Sporozoiten einzudringen, die so dem Untergange geweiht sind: Repulsionshypothese. So interessant auch diese Hypothese ist, darf man mit Fug und Recht außerdem annehmen, daß das Chinin auch schon eingedrungene Parasiten zu vernichten imstande ist.

Ehe Morgenroths Veröffentlichung erschien, hatte ich schon Versuche beendet, auf einfacherem Wege in vitro die Chininspeicherung der roten Blutkörperchen nachzuweisen bzw. nachzuprüfen; wegen anderweitiger Inanspruchnahme unterblieb bisher die Bekanntgabe.

1.

Defibriniertes Schweineblut wurde mit unterschiedlichen Mengen Chininsalz versetzt, die Differenzen durch physiologische Kochsalzlösung ausgeglichen. Alle Proben wurden doppelt angesetzt und 3 Stunden bei 37° gehalten.

Nr.	Def. Blut ccm	10 % NaCl ccm	0,9 % NaCl ccm	Chin. hydrochlor. 3 % ccm	Konzentration %
1	13	0,18	—	2	0,4
2	13	0,09	1	1	0,2
3	13	—	2	—	Kontrolle

Nach dieser Zeit sind in Gläschen 1 und 2 alle Blutkörperchen unter Erhaltung der Delle prall aufgetrieben, erscheinen sonst intakt, und alle liegen einzeln. Seitlich betrachtet sind alle starr halbmondförmig. Nach dem Zentrifugieren

haften die vielmals dunkler gefärbten Blutkörperchenkuchen fest am Boden, die Sera sind stark hämolytisch gefärbt, in Gläschen 1 stärker als in 2. In der Kontrolle 3 zeigen die Blutkörperchen gegenüber einer Probe keine Unterschiede, fast alle sind schwach zusammengedrückt, mit groben Stechapfelfortsätzen, viele liegen, wenn auch verzerrt, reihenweise beisammen. Das Serum ist nur wenig gerötet, und die zentrifugierten Blutkörperchen lockern sich beim Umschwenken mit physiologischer Kochsalzlösung leicht vom Boden.

Nach Auffüllen mit Kochsalzlösung wird wiederum zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit ist bei Kontrolle 3 nicht, bei 1 und 2 sehr stark hämolysiert. Bei 1, soweit Blutkörperchen noch vorhanden sind, sehen sie wie vorher prall aufgetrieben aus und haften tiefdunkelrot, verklebt am Boden. In 2 kleben sie etwas lockerer am Boden, aber nur wenige besitzen noch die aufgetriebene Form, die meisten haben ausgeprägte Stechapfelform angenommen. In der Kontrolle besitzen die Blutkörperchen feine Stechapfelfortsätze und lösen sich leicht vom Boden ab.

Das dritte Zentrifugat war bei 1 und 2 wieder sehr stark hämolytisch verfärbt, bei Kontrolle 3 keine Hämolyse. Bei 1 fanden sich kaum noch intakte, aber nun auch kollabierte Blutkörperchen.

Das Ergebnis dieses Versuches läßt sich dahin zusammenfassen, daß die Blutkörperchen für Chinin permeabel sind, daß die Diffusion nicht bis zur gleichmäßigen Verteilung zwischen Blutkörperchen und Serum geht, daß vielmehr eine Speicherung in ersteren stattfindet, die den osmotischen Druck innerhalb der Zelle verstärkt, was bis zum Zerreißen ihrer Membran, bis zur Hämolyse führen kann. Andere als physikalische Ursachen kann man nicht verantwortlich machen. Die nach dem zweiten Zentrifugieren noch vorhandene, ballonartige Auftreibung der Erythrocyten in Gläschen 1 — die des Gläschens 2 kehren ziemlich zur Norm zurück — muß so gedeutet werden, daß das Alkaloid der unterdessen der Zerstörung anheimgefallenen Blutkörperchen nun wiederum die noch intakten angehen kann, wodurch diese kein Chinin an die umgebende Flüssigkeit abzugeben vermögen, während dies bei 2 infolge des vielmals geringeren Zerfalles möglich war.

Nebenbei wurde geprüft, ob die chininbeladenen Blutkörperchen und ebenso die hämoglobinhaltigen Zentrifugate die Blutreaktionen mit Phenolphthalein und mit Guajacharz gaben. Die Reaktionen fielen positiv aus.

2.

Ein weiterer Versuch wurde derart angestellt, daß Blut mit fallenden Chinindosen einige Zeit in den Brutschrank kam, hernach zentrifugiert und die Blutkörperchenbreie noch 5 mal mit Kochsalzlösung versetzt und wieder abgeschleudert wurden. Ein mehr oder weniger starkes Auswaschen des Alkaloids aus den Blutkörperchen ist dabei anzunehmen. Dann wurde Formaldehyd zugefügt und noch einigemale durch Zentrifugieren und Wiederauffüllen gewaschen. In einer zweiten Versuchsreihe wurde Formaldehyd nach dem ersten Abschleudern zugegeben und dann sorgsam ausgewaschen. Die Weiterführung dieser Anordnung, die das einmal eingetretene Chinin fixiert, scheiterte jedoch an der Unlöslichkeit der gehärteten Blutzellen in Natronlauge. Es wurde versucht, Natriumhypobromid zu verwenden, jedoch ergaben einige orientierende Vorversuche, daß hierbei Verluste eintreten können, da man die Menge des Lösungsmittels nur gefühlsmäßig zusetzen kann. So ergab eine Kontrolle in ganzem Blut 0,0300 g, in Serum 0,0295 g, Härtung und sehr vorsichtiges Auflösen mit Natriumhypobromid 0,0298 g, ebenso mit der doppelten Menge des Lösungsmittels 0,0279 g Chinin. Vielleicht ließe sich dieser Gedankengang doch noch zu einer anwendbaren Methode gestalten.

3.

Zu diesem Versuche wurde das gegen Chinin resistentere Hammelblut verwandt, in gleicher Anordnung wie bei 3, nur daß hier nach dem fünften Zentrifugieren mit Alaun gehärtet

Nr.	Def. Blut ccm	10 % NaCl ccm	0,9 % NaCl ccm	Chin. hydrochlor. 3 % ccm	Konzentration %
1	13	0,18	—	2,0	0,4
2	13	0,13	0,5	1,5	0,3
3	13	0,09	1,0	1,0	0,2
4	13	0,05	1,5	0,5	0,1
5	13	0,02	1,75	0,25	0,05
6	13	—	2,0	—	Kontrolle

und dann noch 5mal gewaschen wurde. Die schließlich erhaltenen Blutkörperchen, die nach der Härtung immer stark am Boden kleben und schlecht zu suspendieren sind, sehen durchgängig intakt aus und sind meist nur etwas zusammengedrückt und vereinzelt mit Stacheln besetzt. Sie wurden in Natronlauge gelöst, ebenso die letzten Zentrifugate mit Natronlauge versetzt, mit Äther sorgsam extrahiert und wie üblich weiterbehandelt. Wie zu erwarten war, ergaben sich in keinem Falle wägbare Rückstände, die mit einem Tropfen verdünnter Salpetersäure und 1 ccm Wasser gelöst und auf Fluorescenz untersucht wurden. Dann wurde je ein Tropfen Ammoniakflüssigkeit und Essigsäure zugefügt und je die Hälfte der Thalleiochin- und der Quecksilberjodidprobe unterworfen. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle.

In	Reaktion	1	2	3	4	5	Kontrolle
Blutkörperchen	Fluorescenz	++++	++++	+++	++	+	0
"	Thalleiochin	+	+	+	0	0	0
"	HgJ_2-Niederschläge	+++	+++	++	+	+	0
Zentrifugat . .	Fluorescenz	++	++	+	Sp.	Sp.	0
" . .	Thalleiochin	0	0	0	0	0	0
" . .	Hg_2J-Trübungen	schwach, von 1 schwach bis 5 abfallend sehr schwach					0

4.

Der gleiche Versuch wurde wie bei 3 wiederholt, aber ohne Alaunhärtung, also die Blutkörperchen 10mal mit Kochsalzlösung aufgeschwemmt und abgeschleudert. Das Resultat zeigt die Tabelle.

In	Reaktion	1	2	3	4	5	Kontrolle
Blutkörperchen	Fluorescenz	++++	+++	+++	++	++	0
Zentrifugat . .	"	++++	+++	++	+	+—Sp.	0
Blutkörperchen	HgJ_2	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	0
Zentrifugat . .	"	+++++	+++++	+++	++	+	0

Die Intensität der Reaktionen, die nur für jede einzelne Untersuchung vergleichbar ist, habe ich mit Kreuzchen bezeichnet. Für Versuch 3 und 4 darf wohl als sicher angenommen werden, daß von dem ursprünglich im Serum ver-

bliebenen Chinin durch das 10 malige sorgfältige Auswaschen — je $^1/_2$ Stunde zentrifugiert bei 3150 Umdrehungen — wohl nichts mehr nachweisbar in das zehnte Zentrifugat herübergekommen ist. Das im zehnten Ablauf gefundene Alkaloid muß auf Konto des in den Blutkörperchen gespeicherten Chinins, das in die umgebende Flüssigkeit diffundierte, gesetzt werden.

Aus den Versuchen 3 und 4 geht, besonders aus dem Ausfall der Quecksilberjodidprobe deutlich hervor, daß die Blutkörperchen eine verhältnismäßig große Chininmenge anfänglich aufgenommen haben müssen, da trotz des häufigen Auswaschens sich noch Niederschläge bilden konnten. Wollte man auch annehmen, daß nicht alles nicht-gespeicherte Chinin fortgewaschen wäre, so ginge trotzdem aus dem Resultate hervor, daß die Erythrocyten am Ende des Versuches mehr Chinin enthalten als die Waschflüssigkeit.

Die Fluorescenz obiger Flüssigkeiten konnte mit bloßem Auge im zerstreuten Tageslichte nicht wahrgenommen werden, sie tritt dagegen hervor, wenn man ein durch eine Linse zusammengefaßtes Strahlenbündel der Bogenlampe oder Sonne hineinfallen läßt, wobei seitlich abzublenden ist.

5.

Dieser Versuch sollte zeigen, ob Chinin in kleinsten Mengen, die noch eben durch Fluorescenz nachweisbar sind, vollständig von den roten Blutkörperchen adsorbiert wird, oder ob auch dann noch ein Gleichgewichtszustand sich einstellt zwischen Serum und den roten Blutzellen, wie es bei höheren Konzentrationen der Fall ist. Hierzu wurde 2 $^0/_0$iges Hammelblut mit Chinin von 1 : 10000 bis 1 : 10000000 versetzt und die Proben in den Brutschrank gestellt. Nach je 2, 4 und 8 Stunden wurden jedesmal 10 ccm mit 1 ccm 0,4 $^0/_0$iger Ricin-Kochsalzlösung vermischt und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Kontrollen ohne Chinin wurden ebenso behandelt. Dann wurde klar und farblos abgegossen, zu je 5 ccm 2 Tropfen verdünnte Salpetersäure und 12 Tropfen 20 $^0/_0$iger Silbernitratlösung gegeben, und alle Proben einer Reihe, mit der stärksten Verdünnung beginnend, durch das gleiche Filter gegossen, was zwar eine gewisse Verschiebung der Konzentration bedingt, die

aber im Versuch und in der Kontrolle gleichartig erfolgte. Die Kontrollen zeigten keine Fluorescenz, auch nicht die Verdünnungen 1:10 und 1:5 Millionen, und man könnte dies auf Konto der Speicherung durch die Blutkörperchen oder der Adsorption durch das Chlorsilber und des Filters setzen. Dagegen fluorescierte die Verdünnung 1:2 Millionen noch, wenn auch äußerst schwach, die zu 1:1,5 und 1:1 Millionen entsprechend stärker, aber immer schwächer als eine entsprechend starke Kontrolle Chininlösung. Daraus darf man schließen, daß eine Speicherung in den Blutkörperchen erfolgt, die aber immer nur, anscheinend auch in den stärksten Verdünnungen, zu einem gewissen Grade führt, nämlich bis der Gehalt in den roten Blutkörperchen im Gleichgewichte ist mit dem Chiningehalt der umgebenden Flüssigkeit.

6.

Die bisherigen Versuche haben nur qualitativ dargetan, daß Chinin von den roten Blutkörperchen aufgenommen wird. Die quantitative Bestimmung in den mit Formaldehyd gehärteten Blutzellen scheiterte an deren Unlöslichkeit in Natronlauge, die Härtung mit Alaun schien für diesen Zweck nicht geeignet. Ich habe deshalb versucht, die Menge des gespeicherten Chinins indirekt zu ermitteln, nämlich durch Wägung des im Serum verbliebenen Alkaloides.

Es wurde, wie in dem Schema zu dem Versuche 3, das doppelte Quantum Hammelblut mit 0,4, 0,2, 0,1 und 0,05 $^0/_0$ Chinin versetzt, 5 Stunden in den Brutschrank gestellt, scharf zentrifugiert und von den klaren, teils hämolytisch verfärbten Sera aliquote Teile zur Chininbestimmung entnommen. Einmal wurden Kontrollen ohne Chinin, jedesmal aber Kontrollen ohne Blut mit gleicher Menge Chinin angesetzt, um eventuelle Unstimmigkeiten der Pipetten zu umgehen. Alle Proben wie die Kontrollen wurden unter genau den gleichen Bedingungen geprüft. Je 10 ccm wurden nach Zusatz von 3 ccm Natronlauge 3 mal mit 20 ccm Äther extrahiert, die Ätherauszüge mit 10 ccm $^n/_{10}$-, dann mit 10 ccm $^n/_{20}$-Salzsäure, dann noch mit 5 ccm Wasser ausgeschüttelt, die vereinigten sauren Extrakte mit Äther einmal gereinigt, dann 2 ccm Ammoniakflüssigkeit zugefügt und dreimal mit 25, 15 und 10 ccm Äther ausgezogen.

Die Ätherauszüge wurden mit wenig geglühtem Natriumsulfat getrocknet, filtriert, die Filter quantitativ ausgewaschen. Die Rückstände wurden bei 120° getrocknet und gewogen. Vier Kontrollen mit Blut ohne Chinin ergaben so Rückstände: je einmal von — 0,1 mg und + 0,4 mg, zweimal von + 0,1 mg.

Nr.	Kontrolle	Ganzes Blut	Blutkörperchen	Verschwundenes Chinin %
1	0,0327	0,0198	—	39,5
2	0,0182	0,0101	—	44,5
3	0,0095	0,0049	—	48,4
4	0,0055	0,0025	—	54,5
5	0,0319	0,0194	—	39,2
6	0,0166	0,0102	—	38,5
7	0,0083	0,0052	—	37,3
8	0,0051	0,0033	—	35,3
9	0,0324	0,0195	0,0186	39,8 und 42,6
10	0,0162	0,0094	0,0089	42,0 „ 45,1
11	0,0089	0,0056	0,0056	37,1 „ 37,1
12	0,0052	0,0031	0,0029	40,4 „ 44,8

Diese Ergebnisse zeigen überzeugend, daß das Chinin weitgehend von den Erythrocyten gespeichert wird, und es hat sich dabei kein oder kaum ein Unterschied ergeben, ob ganzes Blut oder 3mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Blutkörperchen verwandt wurden. Absolut genaue Werte bieten diese Zahlen nicht; das Volumen der roten Blutkörperchen spielt bei der Versuchsanordnung nur eine geringe Rolle, eher wäre die von Gläschen 1 bis 4 abfallende Hämolyse in Rechnung zu stellen. Jedenfalls aber dürfen obige Zahlen auf möglichst angenäherte Werte Anspruch erheben. Mit geringeren Chininmengen, wie sie für den menschlichen Organismus in Betracht kommen, zu arbeiten, war leider wegen der Grenzen der Wägbarkeit und der dadurch bedingten Zunahme der Versuchsfehler nicht angängig, eine Methode aber, die auf anderen Prinzipien beruht, zu benutzen, war ich nicht in der Lage. Mit der gewöhnlichen, oben angedeuteten Anordnung der Fluorescenzprobe quantitative Bestimmungen vorzunehmen, erachte ich für nicht möglich, eine Beschreibung der Gehaltsermittlung mittels des Fluorescenzmikroskopes, das Hartmann und Zila dazu benutzten, stand mir nicht zur Verfügung.

Die von den roten Blutkörperchen aufgespeicherten Mengen Chinin bewegen sich in Grenzen zwischen 35 bis 48% (einmal 54,5%), und es macht sich kein Unterschied bemerkbar, ob dem Blute mehr oder weniger Chinin zugegeben war. Auch hieraus muß man schließen, daß das Chinin nicht selektiv von den Blutkörperchen angezogen wird, sondern daß ein Gleichgewicht sich einstellt, Blutkörperchen : Serum = 35 — 48 : 65 — 52 oder im Mittel aller Versuche 41,6 : 58,4, das ist annähernd 2 : 3. Natürlich ist es nicht erlaubt, diese in vitro mit so großen, biologisch nicht möglichen Chininmengen gewonnenen Einblicke ohne weiteres auf die im zirkulierenden Blute sich abspielenden Vorgänge zu übertragen; aber anschließend möchte ich nochmals auf die von Morgenroth in ganz anderer Versuchsanordnung ermittelte Feststellung hinweisen, nach der bei einer Lösung von 1 : 100000 (Vollblut) 50% der Alkaloidmenge — ob in Wirklichkeit 25 oder 75% ließ die Versuchsanstellung unentschieden — in Verlust geraten sind.

Literatur.

[1]) F. Mariani, Atti della società per gli studi della malaria **1904**.
[2]) G. Kerner, Arch. f. d. ges. Physiol. **2**, 200, 1869; **3**, 93, 1870.
[3]) A. Merkel, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **47**, 165, 1902.
[4]) R. Schmitz, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmokol. **56**, 301, 1907.
[5]) G. Giemsa und H. Schaumann, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene **12**, Beiheft 3, 1907. — G. Giemsa, Biochemische Methoden bei Malariauntersuchungen, in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden **6**, 195, 1912.
[6]) M. Flamini, Atti della società per gli studi della malaria **1906**.
[7]) Teichmann, Deutsche med. Wochenschr. **43**, 1092, 1917.
[8a]) G. Giemsa und J. Halberkann, Deutsche med. Wochenschr. **43**, 1501, 1917. — [b]) Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene **21**, 333, 1917. — [c]) Münch. med. Wochenschr. **65**, 972, 1918.
[9]) H. Hartmann und L. Zila, Münch. med. Wochenschr. **64**, 1597, 1917. — Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **83**, 221, 1918.
[10]) Warburg, Münch. med. Wochenschr. **65**, 591, 1918.
[11]) A. Schittenhelm und H. Schlecht, Deutsche med. Wochenschr. **44**, 314, 1918.
[12]) H. Scholz, Deutsche med. Wochenschr. **44**, 965, 1918.
[13]) A. Plehn, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **22**, 381, 1918.
[14]) E. Küster und H. Wolff, Berl. klin. Wochenschr. **56**, 123, 1919.
[15]) M. Nishi, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **60**, 312, 1909.
[16]) S. Neuschloß, Münch. med. Wochenschr. **64**, 1217 u. 1284, 1917.

[17]) H. Ziemann, Handb. d. Tropenkrankh. V. 1. Die Malaria **1917**.

[18]) H. Skraup, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **12**, 1104, 1879.

[19]) Personne, Journ. d. chim. et pharm. **28**, 354, 1878.

[20]) J. Katz, diese Zeitschr. **36**, 144, 1911.

[21]) G. Giemsa und J. Halberkann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **51**, 1325, 1918.

[22]) A. C. Oudemans, Annal. d. Chem. **44**, 182, 1876.

[23]) O. Hesse, Annal. d. Chem. **176**, 256, 1875; **182**, 135, 1876.

[24]) P. Rabe, Annal. d. Chem. **373**, 100, 1910 und Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **51**, 466, 1918.

[25]) C. Kelber, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **49**, 55, 1916.

[26]) G. Giemsa und H. Werner, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **16**, Beiheft 4, 65, 1912.

[27]) O. Hesse, Annal. d. Chem. **241**, 265, 1887.

[28]) G. Giemsa, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **12**, Beiheft 5, 78, 1908.

[29]) A. Plehn, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **13**, Beiheft 6, 145, 1909.

[30]) P. Großer, diese Zeitschr. **8**, 98, 1908.

[31]) B. Nocht, Verhandl. d. Deutsch. Kolonialkongresses **1905**, 218. — Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **12**, Beiheft 5, Diskussion, 97, 1908.

[32]) J. Morgenroth, Deutsche med. Wochenschr. **44**, 961 und 988, 1918.

Über Jod-Stärkereaktion und ihre Verwendung für eine colorimetrische Eiweißbestimmung bei Immunitätsprozessen.

Von

C. Lange.

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie.)

(Eingegangen am 22. März 1919.)

Inhaltsangabe.

Seite

Einleitung. Versuch einer Fermentbindung als Ersatz der Komplementbindung, der Veranlassung gibt, die Diastasebestimmung mittels Jodstärkereaktion genauer zu analysieren, und bei dem sich die Möglichkeit ergibt, die Jodstärkereaktion für eine quantitative colorimetrische Eiweißbestimmung zu benutzen . . . . 47—54

I. Die Diastasebestimmung mittels Jodstärkereaktion, ihre Beeinflussung durch Körper, die schon bei Zimmertemperatur in kurzer Zeit Jod chemisch binden, speziell durch Eiweißkörper. Kritik der quantitativen Diastasebestimmung und Möglichkeit einer Verfeinerung . . . 54—57

II. Untersuchungen über die Jodstärke: Art der Bindung, Beeinflussung der blauen Farbe durch physikalische Faktoren . . . . 58—69

Das Zustandekommen der blauen Jodstärke wird erklärt durch eine gegenseitige Kolloidausfällung, resp. Löslichkeitsbeeinflussung zwischen dem kolloidalen Jod und der kolloidalen Stärke. Die Farbqualität (Jodstärke, Joddextrin) ist abhängig vom Dispersitätsgrade . . . . 58—67

Die unter Einwirkung verschiedener physikalischer Faktoren verschiedene Intensität der Blaufärbung bei gleichen Mengen Jod und Stärke ist abhängig vom Quellungszustand des elektronegativen Kolloidkomplexes Jodstärke, bei stärkerer Quellung neigt die Blaufärbung zum Verschwinden . 67—69

III. Quantitative Eiweißbestimmung mittels der Jodstärkereaktion. Jodierung mit und ohne Isolierung des

Eiweißes, bei originaler oder saurer Reaktion mit oder ohne Katalysatoren. Allgemeine Grundlagen der Methodik für die Bestimmung des Gesamteiweißes in Serum, bzw. Plasma und Lumbalflüssigkeit und zur Standardisierung von Vaccinen. Bedeutung dieser Bestimmung für die Analyse von Immunitätsprozessen . . . . 69—84

Den Ausgangspunkt für die im folgenden dargestellten Untersuchungen bildeten Versuche, eine Technik auszubilden, wobei analog der Komplementbindung die Adsorption von Fermenten als Indicator für die vollzogene Reaktion zwischen Antigen und Immunkörper. resp. bei der Wa.-R. zwischen Luesserum und Extrakt verwendet werden sollte.

Untersuchungen in dieser Richtung scheinen in verschiedener Richtung von Interesse: erstens als dadurch die Frage eine Klärung erfahren könnte, ob spezifische, immunisatorisch erzeugbare Antifermente tatsächlich vorhanden sind oder nur durch eine „Bindung" vorgetäuscht werden, analog den Versuchen über die Feststellung immunisatorisch erzeugbarer spezifischer Antikomplemente. Zweitens scheinen Veränderungen der Versuchsanordnung möglich, die bei der Komplementbindung durch das Arbeiten mit einem hämolytischen System, insbesondere aber mit Blutkörperchen, die gegen verschiedene Änderungen des Mediums sehr empfindlich sind, unmöglich gemacht werden.

Versuche in dieser Richtung, wenn auch mit negativem Erfolge, wurden bereits von Hailer unternommen. Er verglich die Bindung von Komplement und Ferment an spezifische und nichtspezifische Niederschläge und Suspensionen. Für das Labferment, das nur geprüft wurde, kam Hailer zu Feststellungen von Unterschieden in der Adsorptionsfähigkeit zwischen Komplement und Ferment, die sich darauf bezogen, daß Lab z. B. durch Kaolin sehr stark gebunden wird, daß es dagegen von Aufschwemmungen von SiO_2 und spezifischen Präcipitaten, die Komplement stark binden, nicht adsorbiert wird. Wir hatten schon vor einer Reihe von Jahren Versuche des Ersatzes von Komplement gerade durch Lab gemacht, weil uns die ohne weiteres sichtbar zu machende Fermentwirkung besonders erwünscht schien und beim Lab wenigstens insofern eine Ähnlichkeit in der Adsorption an Oberflächen besteht, als es ebenso wie das Komplement durch Schütteln inaktiviert werden kann. Wir kamen damals zu keinen greifbaren Resultaten; die Untersuchungen von Hailer lassen den vermutlichen Grund dafür erkennen. Nun ist aber bekannt, daß die Adsorptionsfähigkeit verschiedener Fermente gegenüber verschiedenen Substanzen sehr erhebliche Differenzen zeigt.

Die Untersuchungen von Hailer lassen es danach nicht ausgeschlossen erscheinen, daß trotzdem Fermente gefunden werden können, die in ihrer Adsorptionsfähigkeit an spezifische Präcipitate dem Komplement gleichstehen oder es sogar noch übertreffen. Neben dem Lab prüften wir damals Fibrinferment, aus dem gleichen Grunde, wie schon beim Lab angegeben, und Tyrosinase. Beim Fibrinferment zeigten sich Differenzen, die sich aber als ungeeignet erwiesen, um darauf eine praktische Methode aufzubauen. Es erschienen dann die Arbeiten von Hirschberg und Klinger über eine Gerinnungsreaktion bei Lues, die uns veranlaßten, dieses spezielle Gebiet noch einmal zu untersuchen. Wir wollen hier nicht näher darauf eingehen, da wir an anderer Stelle über diese Untersuchungen berichten werden, wir wollen nur auf die Differenzen hinweisen; während wir ebenso wie Hailer eine Fermentbindung versuchten, ist die Gerinnungsreaktion etwas durchaus anderes, nämlich eine Kofermentbindung. Gebunden wird, resp. in Reaktion tritt das Koferment des Fibrinferments, das Cytozym, während die Fermentwirkung nur den Indicator der stattgefundenen Kofermentinaktivierung darstellt. Derartige Kofermentbindungen kann man auch in anderer Form zur Demonstrierung von Immunitätsvorgängen heranziehen, z. B. bei luetischen Seren mit gallensauren Salzen, deren Kofermentinaktivierung durch Ausbleiben ihrer verstärkenden Wirkung auf Lipasen nachgewiesen werden kann. Eine direkte Fibrinfermentbindung, die Hirschberg und Klinger nicht gelang, konnten wir unter anderen Bedingungen ebenfalls nachweisen, doch erscheint die Fermentnatur des Gerinnungsvorgangs uns so wenig gesichert, daß hieraus theoretische Schlüsse nicht gezogen werden hönnen.

Wir mußten diese erklärenden Ausführungen erst bringen, um verständlich zu machen, wie wir zu den gleich darzustellenden Versuchsergebnissen und Versuchsanordnungen kamen.

Bei der Prüfung verschiedenster Fermente auf ihre Bindungsfähigkeit im Vergleich mit Komplement versuchten wir auch diastatische Fermente verschiedener Abstammung, weil wir hier in der Methode der quantitativen Bestimmung diastatischer Fermente nach Wohlgemuth eine Methode zu haben glaubten, die eine Demonstrierung von Fermentwirkungen fast ebenso bequem und außerdem quantitativ viel feiner abstufbar erwarten ließ, als bei Fermenten mit unmittelbar sichtbarer Fermentwirkung, wie z. B. Lab, Fibrinferment oder Tyrosinase.

Wir wollen die dabei gefundenen Untersuchungsergebnisse kurz anführen, weil sie uns bei der Bewertung der quantitativen Resultate, die man mit der Methode erzielen kann, von praktischer Bedeutung erscheinen, da ja auch diese Methode wegen ihrer großen Bequemlichkeit für klinische Zwecke

in ausgedehntem Maße herangezogen wurde. Man kann nun bei der Bestimmung diastatischer Fermente drei Methoden unterscheiden: erstens die Verfahren, wobei die quantitative Bestimmung des entstehenden Zuckers als Maß der Stärke des diastatischen Ferments genommen wird; zweitens die Methoden, die hierzu den Ausfall der Jodstärkereaktion in irgendeiner Weise benutzten, drittens die Methode von Walther, die analog der Pepsinbestimmung mit Mettschen Röhrchen die Länge eines verdauten Stärkecylinders als Maß der diastatischen Kraft wählt.

Die Wohlgemuthsche Methode benutzt die Jodstärkereaktion. Wir werden nun ausführen, welche Verhältnisse hierbei eine genaue quantitative Abschätzung der diastatischen Kraft einer Fermentlösung bis zu einem gewissen Grade illusorisch erscheinen lassen. Wir werden dabei genauer auf die Verhältnisse der Jodstärkereaktion überhaupt und ihre Beeinflussung durch jodbindende und andere Körper in der Reaktionsflüssigkeit, sowie durch andere Faktoren eingehen müssen, um dann zu zeigen, welchen besonderen Einfluß hierbei Eiweißkörper, resp. der aromatische Kern im Eiweißmolekül haben und wie man diese Verhältnisse für praktische Zwecke zu einer quantitativen Eiweißbestimmung nutzbar machen kann.

Nach Wohlgemuth wird die diastatische Kraft einer Fermentlösung auf die Weise bestimmt, daß man sich eine Reihe mit fallenden Mengen der zu untersuchenden Fermentlösung herstellt und zu jeder Verdünnung 5 ccm einer $1\,^0/_0$igen Stärkelösung zugibt. Nach Ablauf der gewünschten Versuchsdauer werden sämtliche Reagensröhrchen etwa bis fingerbreit vom Rande mit Wasser aufgefüllt und je ein Tropfen einer $^n/_{10}$-Jodlösung zugesetzt und umgeschüttelt. Hierbei treten nun je nach der erreichten Stufe des Stärkeabbaus verschiedene Färbungen auf; zur Bestimmung der Diastase wird nun der unterste Grenzwert (limes) benutzt, wo zum erstenmal die rein blaue Farbe unverkennbar auftritt. Das mit Wasser aufgefüllte Röhrchen zeigt demnach eine leicht violette Färbung. Dies wird als Ausdruck dafür angenommen, daß in dieser Verdünnung ein Abbau von Stärke nicht mehr erfolgt ist. Auf die übrigen Kautelen bei der Versuchsanordnung brauchen wir in diesem Zusammenhange nicht näher einzugehen, wo uns nur

die Beeinflussung der Jodstärkereaktion durch fremde Faktoren interessiert. Auf eine Fehlermöglichkeit, die vielleicht nicht ausgeschaltet werden kann, außer bei der Methode nach Walther, wollen wir nur kurz hindeuten, daß nämlich die Diastasewirkung bei Mischung z. B. von Serum mit einer Lösung von Stärke durch die hierbei auftretende gegenseitige Kolloidausflockung erheblich beeinflußt werden kann, was zu unkontrollierbaren Fehlermöglichkeiten führen kann, da ja diese Ausfällungen nicht gleichmäßig in der fallenden Reihe abfallen, da derartige gegenseitige Kolloidfällungen von dem Mischungsverhältnis abhängig sind.

Die Verhältnisse bei der Wohlgemuthschen Methode scheinen auf den ersten Blick sehr einfach und durchsichtig, und doch zeigt sich bei näherer Analyse, daß hierbei doch Fehlschlüsse möglich sind. Es liegt uns fern, die praktische Brauchbarkeit der Methode nach Wohlgemuth bezweifeln zu wollen,. aber wir werden nach näherer Analyse sehen, welch große Bedeutung den genauen Mischungsverhältnissen (5 ccm 1%ige Stärke, 1 Tropfen $^{n}/_{10}$-Jod) zukommt, und daß die Methode der Bestimmung der diastatischen Kraft sehr leicht zu direkten Fehlern führen kann, wenn man von diesen Mischungsverhältnissen und der vorgeschriebenen Ablesung der Resultate erheblich abweicht, was ja ohne weiteres möglich und wünschenswert erscheint, wenn man sehr kleine Fermentmengen oder sehr kleine Differenzen im Gehalt an Ferment verschiedener Lösungen feststellen will. Ohne eine besondere Kontrolltechnik, die wir weiter unten geben werden, kann man sich sogar verleiten lassen, eine diastatische Fermentwirkung anzunehmen, wo eine solche gar nicht existiert.

Das Hauptmoment bei der Wohlgemuthschen Methode sehen wir in der Feststellung eines direkten Farbenumschlages von blau zu roten oder bräunlichroten Nuancen; nur dadurch kann ein Abbau von Stärke nachgewiesen werden, nicht etwa auch durch Differenzen in der Intensität der Blaufärbung, und diesem Moment wird ja auch bei der Versuchsanordnung Rechnung getragen. Dagegen ist zu betonen, daß die Methode, wenn man sehr feine Differenzen feststellen will, als recht grob anzusehen ist, was durch die großen Mengen Stärke und Jod bedingt wird, wodurch die enorme Feinheit

der Jodstärkereaktion unter anderen Verhältnissen ausgeschaltet wird.

Arbeitet man mit kleineren Stärkemengen und kleinen Jodmengen, so könnte man hoffen, sehr geringen Stärkeabbau schon dadurch festzustellen, daß man so geringe Jodmengen zugibt, daß Differenzen in der Sättigung der blauen Farbe als Ausdruck der diastatischen Wirkung genommen werden können, bevor ein direkter Umschlag in rotbraun erfolgt. Dies läßt sich auch in der Tat bei etwas komplizierter Versuchsanordnung ermöglichen.

Um diese Verhältnisse leichter verständlich zu machen, wollen wir zurückgreifen auf die anfangs beschriebenen Versuche der Fermentbindung mit diastatischen Fermenten, die möglichen Fehlerquellen werden dabei ohne weiteres deutlich, nebenbei wollen wir nur darauf hinweisen, daß gerade derartige diastatische Fermente für die gewählte Versuchsanordnung ihrer Dialysierfähigkeit wegen weniger geeignet erscheinen als andere hochkomplexe Fermente, die leicht adsorbiert werden, wie z. B. Lipasen.

Wir vermischten präcipitierendes Serum mit dem dazu passenden Eiweiß in verschiedenen Mischungsverhältnissen und gaben dazu kleine Mengen Diastase, z. B. eine sehr verdünnte Lösung von Speichel. Nach verschiedenen Bindungszeiten bei verschiedenen Temperaturen gaben wir nun geringe Mengen Stärke dazu, ließen während einer durch einen Vorversuch passend ausgewählten Zeit im Wasserbad verdauen und gaben dann genau abgemessene Mengen einer so verdünnten Jodlösung dazu, daß eine Blaufärbung entstand, die in der bereits vorhandenen Verdünnung feinere Nuancen erkennen lassen mußte; die ersten Farbumschläge nach rotviolett hin bei wirklicher Verdauung sind übrigens kaum in Verdünnung zu unterscheiden von verdünnten rein blauen Jodstärkelösungen.

Wir wollen hier nicht ausführlicher auf unsere Versuche eingehen und nur die Resultate bringen, soweit sie in diesem Zusammenhang interessieren. Es zeigte sich beim Vergleich von normalen und präcipitierenden Seren in Mischung mit dem dazu gehörigen Antigen, wenn man Diastase, dann Stärke und zum Schluß Jod zugab, stets ein Unterschied bei Vorhandensein des Immunserums nach der entgegengesetzten Richtung

als erwartet wurde, daß nämlich regelmäßig Mischungen mit Immunserum gegenüber denen mit Normalserum eine deutlich schwächere blaue Färbung zeigten. Dies trat ganz ausnahmslos auf bei den verschiedensten Antiseren und Antigenen. Die Deutung war schwierig und widersprach zum mindesten der Annahme durchaus, daß es sich um eine Bindung der Diastase handeln könnte.

Bei näherer Analyse stellte sich dann heraus, daß hier besondere Verhältnisse vorliegen, die bisher anscheinend fast unbekannt geblieben sind und in engstem Zusammenhang mit der Beeinflussung der Jodstärkereaktion durch äußere Faktoren stehen, jedoch mit etwaigen Differenzen in der Fermentwirkung bei der gewählten Versuchsanordnung nichts zu tun haben.

Auffallend schien sehr bald, daß wir bei den verschiedensten Konzentrationsverhältnissen des Fermentes und bei noch so verschieden gewählter Versuchsdauer immer nur denselben Farbenunterschied zwischen den Lösungen mit Immun- oder Normalserum auftreten sahen.

Eine bestimmte Richtung bekam dieser Zweifel sehr bald, als wir bei unseren Versuchen mit Immunseren, die größtenteils zwecks Konservierung mit Carbol versetzt waren, untersuchten, welchen Einfluß der Zusatz von Carbolsäure zum Serum auf den Ausfall der hier angeführten Versuche hätte.

Es zeigte sich nun, daß sehr geringe Unterschiede im Carbolgehalt von Serum genügten, um einen deutlichen Unterschied im Ausfall der Jodstärkereaktion zu ergeben. Die Erklärung liegt natürlich darin, daß das Jod mit dem Phenol direkt schon bei Zimmertemperatur eine feste chemische Verbindung eingeht, trotzdem es vorher in irgendeiner Verbindung mit der Stärke stand, auf die wir noch eingehen werden. Auffallend waren nur und für die Methode der Diastasebestimmung mittels der Jodstärkereaktion von besonderem Interesse die zeitlichen Verhältnisse hierbei. Es ergab sich, daß Jod in kleinen Mengen mit dem Phenol so schnell reagiert, daß eine Blaufärbung der Stärke überhaupt nicht einzutreten braucht oder fast momentan verschwindet, selbst wenn man zu der carbolhaltigen Lösung zuerst Stärke und dann Jod zugibt. Fügt man zu carbolsäurehaltigen Lösungen zuerst Jod und dann sofort Stärke, dann tritt keine Blaufärbung ein, selbst

wenn man solche Jodmengen verwendet, daß sie schon eine recht starke Bläuung hervorrufen können. Maßgebend für diese Verhältnisse ist natürlich die Verteilung — ganz allgemein gesagt — des Jods zwischen Phenol und Stärke und die zeitlichen Verhältnisse dieses Ablaufs. Doch bevor wir näher darauf eingehen können, müssen wir noch ausführen, daß dem Eiweiß bei derartigen Versuchen die gleiche Bedeutung zukommt, wie etwa dem Phenol.

Als wir nämlich den Kontrollversuch anstellten, wie unsere Serummischungen mit Antigen und Ptyalin gegenüber der Jodstärkereaktion sich verhielten, bevor ein Abbau von Stärke stattgefunden haben konnte, ergab sich, daß sich dieselbe Differenz in der Stärke der Blaufärbung ergab wie nach Verdauung; der weitere Versuch ergab, daß auch die Seren allein diese Differenz zeigten. Mischte man also das eine Mal Immunserum mit Stärke und gab dann Jod dazu, so war die Blaufärbung stets geringer als bei Verwendung von Normalserum. Diese Differenz konnte noch ganz erheblich verstärkt werden, wenn man zum Serum zuerst eine bestimmte Menge Jod zugab und dann nach einiger Zeit Stärke; es ergab sich dabei etwa, daß, wenn man zu 1 ccm 1 : 10 verdünnten Serums 0,5 ccm $^{n}/_{250}$-Jod zugab und nach einiger Zeit erst Stärke, das Normalserum eine starke Blaufärbung zeigte, während die Mischung mit Immunserum vollkommen farblos blieb. Die Unterschiede bei den oben dargestellten Versuchen waren damit aufgeklärt und hatten danach gar keinen Zusammenhang mit der gewählten Versuchsanordnung, sondern waren bedingt durch die Differenzen zwischen Normal- und Immunserum.

Da eine derartige Feststellung einer chemischen Differenz zwischen Normal- und Immunseren uns von großem Interesse erschien und alle untersuchten Immunseren betraf, prüften wir dann weiter, welche Körper diesen Unterschied bedingten. Es zeigte sich bald, daß der Unterschied durch den verschiedenen Gehalt an Eiweißkörpern bedingt sei, und daß die angegebene Methode, die sich noch erheblich verfeinern ließ, sich unter bestimmten Bedingungen gut zur quantitativen Bestimmung von Eiweiß verwenden ließ.

Zu ähnlichen Befunden war, wie wir dann fanden, schon Clementi gekommen bei Untersuchungen, welchen Einfluß verschiedene Körper

auf das Verschwinden der Jodstärkereaktion haben; wir bemerken hier gleich, daß er anscheinend nur Körper untersucht hat, die schon bei Zimmertemperatur eine starke chemische Affinität zum Jod, gelöst in Jodkali, haben, die also der Jodstärkeverbindung das Jod entziehen und nicht auch solche Körper, die infolge physikalischer Beeinflussung der Löslichkeit dieses Kolloidkomplexes die Farbreaktion in ihrer Intensität beeinflussen. Außerdem ist für praktische Zwecke der Unterschied nicht zu übersehen, daß bei diesen Untersuchungen es nur darauf ankam, festzustellen, welche Körper eine blaue Jodstärkereaktion zum Verschwinden bringen können, während aus unseren Befunden hervorging, daß die Körper dieser Klasse, wenn sie im Reaktionsgemisch vorhanden sind, ihre Affinität zum Jod bei Zimmertemperatur so momentan geltend machen, daß sie den Ausfall einer erst auftretenden Jodstärkebläuung abschwächen oder verhindern können.

Clementi fand das Furfurol wirksam, daneben hatten Eiweißkörper denselben Einfluß; untersucht wurden Albumine, Globuline, Pflanzenproteine, Albuminoide und Phosphorproteide, die mit verschiedener Schnelligkeit die Blaufärbung der Jodstärkereaktion aufhoben. Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparagin waren ohne Einfluß, Tyrosin bewirkte rasche Entfärbung.

Bei unseren Untersuchungen gaben auch andere Aldehyde als das Furfurol eine Hemmung; besonders stark von anderen Körpern wieder die Gerbsäure, die aber in der Weise wirkt, daß sie die Stärke ausfällt. Auf die Hemmung durch Körper, die das Jod nicht binden, gehen wir später noch ein.

Bevor wir jedoch auf diese Hemmungen und Verstärkungen infolge ihrer physikalischen Beeinflussung näher eingehen, wollen wir noch ausführen, welche Bedeutung die geschilderten Verhältnisse für die quantitative Bestimmung von Diastase mit Hilfe der Jodstärkereaktion haben. Es ist danach zweifellos, daß Farbnuancen in der helleren oder dunkleren Blaufärbung bei der Jodstärkereaktion nicht für einen diastatischen Abbau der Stärke zu sprechen brauchen; derartige Farbenintensitätsdifferenzen werden ja nun bei der Wohlgemuthschen Methode auch nicht beachtet, sondern nur die Qualitätsdifferenzen zwischen den verschiedenen erzielten Farbtönen. Dies ist unbedingt zu beachten, und Abweichungen nach der quantitativen Seite erlaubt die Methode in dieser Form kaum, wenigstens was die große Menge Jod betrifft. Die Stärkemenge scheint keinen so großen Einfluß zu haben, wovon man sich bei Versuchen mit Urin überzeugen kann, dessen Untersuchung auf Diastase nach der Methode Wohlgemuth klinisch viel ver-

wendet wird. Mischt man 1 ccm Urin mit 5 ccm 1%iger Lösung von löslicher Starke und gibt dann 1 Tropfen $^{n}/_{10}$-Jod dazu, so kann nach ganz schnell vorübergehender Blaufärbung, deren Intensität und Qualität man kaum beurteilen kann, die Färbung wieder vollkommen verschwinden. Dies kommt daher, daß der Harn vermutlich durch seinen Gehalt an Phenolen eine außerordentlich starke Fähigkeit hat, Jod zu binden, außerdem ist aber zum mindesten noch eine physikalische Beeinflussung durch Harnstoff sicher.

Es erscheint nun auf den ersten Blick auffällig, daß diese Entfärbung so plötzlich auftreten kann, wo doch so außerordentlich geringe Mengen Jod genügen, um mit Stärke eine erhebliche Blaufärbung zu erzielen. Der Grund kann nur darin gesehen werden, daß das Jod einerseits mit der Stärke eine sehr leicht zu trennende Kolloidverbindung eingeht, dagegen von Phenol mit großer Kraft chemisch gebunden wird. Man kann z. B. die blaue Farbe einer Jodstärkereaktion durch relativ kleine Mengen Phenol sehr rasch zum Verschwinden bringen. Diese Erklärung scheint im gegebenen Fall am nächsten zu liegen, ebenso für den gleichen Einfluß, den Eiweißkörper hervorbringen, doch sind noch andere Verhältnisse denkbar, auf die wir bei Besprechung der Einflüsse verschiedener Faktoren auf den Ausfall der Jodstärkereaktion zu sprechen kommen werden.

Um nun zurückzukommen auf die Bestimmung von Diastase mit der Jodstärkereaktion, so ist jedenfalls eins sicher, daß das Vorhandensein jodbindender Körper in der Reaktionsflüssigkeit einen erheblichen, und zwar momentan sich geltend machenden Einfluß besitzt, der durch die Menge zugegebener Stärke wenig beeinflußt wird; die größere Menge an Stärke ist nicht imstande, etwa das Jod festzuhalten und die chemische Verbindung mit anderen Körpern zu verhindern. Man kann daher wohl ohne Bedenken bei Feststellung schwächerer Fermentwirkungen oder feinerer Differenzen zwischen verschiedenen Lösungen mit der Stärkemenge heruntergehen. Es liegt auf der Hand, daß man allein hierdurch schon eine erhebliche Verfeinerung erzielen kann, was sich sehr einfach demonstrieren läßt: erzielt man in 1 ccm Stärkelösung durch schwache Diastasewirkung eine deutliche rote Farbe, so kann dieselbe ohne

weiteres vollkommen verdeckt werden, wenn man noch 4 ccm unveränderte Stärkelösung und dann das Jod zugibt. Die blaue Farbe überdeckt dann die rote Färbung vollkommen; andererseits können die Verhältnisse noch komplizierter werden, wenn, wie im Urin, solche Mengen jodbindender Körper vorhanden sind, daß die Stärke der Färbung erheblich beeinflußt wird.

Um hier die möglichste Feinheit an Unterschieden zu erzielen, muß man die Jodmenge so bemessen, daß keine zu starke Farbintensität erzielt wird; 1 Tropfen $^n/_{10}$-Jod ist in dieser Hinsicht schon ein sehr erhebliches Quantum; die Farbnuancen werden hierbei durch Zumischung einer gelben Farbnuance auch noch beeinflußt, worauf wir weiter unten noch zurückkommen werden. Will man nun bei der Bestimmung der Diastasewirkung mittels der Jodstärkereaktion, wenn es sich um Feststellung sehr feiner Differenzen handeln soll, eine möglichste Verfeinerung erzielen, so kann man dies auf die Weise erreichen, daß man die Jodmengen, entsprechend dem jeweiligen Vorhandensein jodbindender Körper in der Verdünnungsreihe, die durch einen Vorversuch festzustellen wären, verschieden wählt. Man erhält dann wenigstens auch bezüglich der Farbintensitäten vergleichbare Resultate, die nur durch den Grad der Stärkeverdauung bedingt wären. Die Menge der Jodlösung wäre nach der Menge zu bemessen, die nach ungefähr 10 Minuten bei Zimmertemperatur durch das Substrat restlos gebunden wird, also nach Zufügen von Stärkelösung keine Blaufärbung mehr erkennen läßt. Beim Fermentversuch würden dann die Farbnuancen maßgebend sein, die nach Abschluß der Verdauung und Zugabe der dosierten Jodmengen 10 Minuten danach auftreten, nachdem inzwischen häufig gut durchgemischt ist.

Wir konnten auf die angegebene Weise Herabsetzung der Stärkemenge und Dosierung der Jodmenge eine erhebliche Verfeinerung gegenüber den Resultaten erzielen, die bei genauer Innehaltung der Wohlgemuthschen Vorschriften zu erzielen waren.

Um nun die Resultate zusammenzufassen, die sich bei Prüfung der Diastasebestimmung mittels der Jodstärkereaktion erzielen lassen, so ist es sicher, daß die Methode erheblich weniger fein ist, als man bei der enormen Empfindlichkeit der

Jodstärkereaktion erwarten sollte, da sehr viele wenig beachtete Zwischenreaktionen auftreten, die dieselbe beeinträchtigen. Diese Empfindlichkeit bezieht sich ja auch nur auf den Nachweis geringster Jodspuren mittels Stärke, nicht auf die bei der Diastasebestimmung obwaltenden Verhältnisse, wo nur der qualitative Nachweis des Farbumschlags bei der Stärkeverdauung als Indicator benutzt werden kann, und auch dies ist noch in bestimmter Richtung einzuschränken, als violette Töne allein schon durch die Anwesenheit bestimmter Salze erzielt werden können, also nur rote oder rotbraune Färbungen verwendbar sind.

Die Menge der zugefügten Stärke scheint uns unter den geschilderten Verhältnissen wenig von Bedeutung zu sein, so daß man sie wohl herabsetzen kann. Auch die quantitativen Verhältnisse der Jodbindung durch andere Körper lassen sich bis zu einem gewissen Grade ausschalten, aber selbst bei diesen unzweifelhaften Verfeinerungen leistet die Methode in quantitativer Beziehung vielleicht weniger als der Nachweis des abgespaltenen Zuckers zur Bestimmung der Wirksamkeit von Diastasen; sie hat vor derselben nur die bequemere Ausführung voraus.

Beeinträchtigen nun besondere Umstände die Feinheit der Jodstärkereaktion für den Nachweis der Diastasewirkung, so ist diese Feinheit vollkommen ausgenützt, wenn wir die Reaktion dazu benutzen, quantitativ Körper zu bestimmen, die eine ausgesprochene Affinität zum Jod besitzen. Für die Eiweißbestimmung in bestimmten Körperflüssigkeiten, wo uns diese Verhältnisse gerade vom Standpunkt der Immunitätslehre interessieren, liegen die Verhältnisse in dieser Richtung vielleicht noch günstiger als bei der Bestimmung der Phenole mit Jod im Harn, wo andere jodbindende Körper, zum Teil wohl Aldehyde, erst durch ein umständliches Verfahren ausgeschaltet werden müssen, während die Feststellung des Eiweißgehaltes in Serum oder Liquor mittels Jodstärkereaktion sich ohne besondere Vorbehandlung durchführen läßt. Hier wären ja, besonders auch beim Serum, derartig einfache Verfahren sehr erwünscht, wo manchmal schon die Feststellung von kleinen Differenzen von erheblichem Interesse sein könnte, ohne daß der absolute Gehalt mit anderen Methoden bestimmt zu werden

brauchte, was sich nur äußerst schwierig und ungenau durchführen läßt. Diesem Umstand ist wohl auch die Tatsache zuzuschreiben, daß die Verhältnisse des Eiweißgehalts im Serum bei Immunitätsvorgängen so wenig erforscht sind. Anders liegen die Verhältnisse beim Liquor, wo schon gute Verfahren bekannt sind, aber auch hier wäre jede Verfeinerung außerordentlich wertvoll aus dem Grunde, weil der Liquor normalerweise einen so konstanten Eiweißgehalt besitzt, daß jede Erhöhung, sobald sie sich sicher nachweisen läßt, als pathologisch anzusehen ist; die bekannten Verfahren reichen dafür noch nicht so weit aus, daß nicht weitere Verfeinerungen erwünscht wären. Bei dem äußerst geringen Normalgehalt des Liquors an Eiweißkörpern läßt sich eine geringe absolute Vermehrung relativ leicht feststellen, da diese Vermehrung prozentual ausgedrückt gleich sehr große Werte annimmt, umgekehrt macht eine ebenso starke Eiweißvermehrung im Serum prozentual nur geringe Differenzen aus bei dem hohen Normalgehalt an Eiweiß. Eine Eiweißvermehrung im Serum läßt sich bei der großen Ungenauigkeit der bisher bekannten Methoden demnach sehr schwer feststellen. Bedenkt man aber, welche hohe Bedeutung bei allen Immunitätsprozessen im Liquor dem Nachweis der geringsten Eiweißerhöhung zukommt, so läßt sich ermessen, daß derartige Untersuchungen auf das Serum ausgedehnt wohl zu manchen interessanten Resultaten bei der Analyse von Immunitätsvorgängen führen müssen, wenn man nur eine bequeme und hinlänglich exakte Untersuchungsmethode für diesen Zweck besitzt. Es scheint uns aber nach unseren bisherigen Untersuchungen zweifellos, daß, wenn es nur auf quantitative Verhältnisse der Eiweißbestimmung ankommt, ohne Berücksichtigung der Spezifitätsverhältnisse, die chemischen Reaktionen den serologischen Methoden des Eiweißnachweises — wenigstens mittels der Technik der Präcipitation — gleichkommen, zum Teil auch überlegen sind; von rein chemischen Methoden, die wir im Auge haben, verweisen wir hier nur auf die von uns angegebene Methode der Liquoruntersuchung mit kolloidalem Gold. Auch nach anderer Richtung liegen die Verhältnisse verschieden für Blut und Liquor, und zwar auch hier wieder günstiger für den Liquor, wenn es sich um Feststellung von Eiweißvermehrung im Verlauf immunisatorischer Prozesse —

ganz allgemein gesagt — handelt. Der Unterschied liegt darin, daß die Eiweißbestimmung im Liquor an der Flüssigkeit vorgenommen werden kann, wie sie sich im Körper vorfindet, das Blut aber gerinnt. Nun nehmen die bei Immunitätsvorgängen interessierenden Eiweißkörper sowohl Antigene als Antikörper, in einer Reihe der Eiweißkörper, geordnet nach ihrer steigenden Kolloidalität, die höchste Stufe ein; sie werden am leichtesten bei allen Fällungen mitgerissen, finden sich daher auch bei allen Salzfällungen meist in der Fraktion, die bei niedrigstem Salzgehalt ausfällt. Das gleiche trifft zu bei der Gerinnung des Blutes. Eine Menge dieser Stoffe werden in das Blutkoagulum mit hineingerissen. Es ergibt sich nun hieraus die Aufgabe, derartige Untersuchungen nicht nur am Serum, sondern auch am Gesamtblut oder wenigstens am Plasma auszuführen. Wir werden später zeigen, daß die ersten Eiweißvermehrungen im Blut sich am Plasma und später erst am Serum zeigen; wir glauben, daß diese Feststellung auch für rein serologische Methoden von Bedeutung sein kann. Für die Eiweißbestimmung im Urin ist das jodometrische Verfahren kaum brauchbar zu gestalten, das spielt aber insofern gar keine Rolle, als hier die Feststellung so feiner Unterschiede, wie sie uns im Serum und Liquor bei Immunitätsvorgängen von großer Bedeutung wären, klinisch kaum von Interesse ist. Für die hier vorliegenden Bedürfnisse genügen die bekannten Verfahren den heutigen Ansprüchen.

Um nun für eine derartige Methodik eine genügend sichere Unterlage zu schaffen, mußten die Verhältnisse nach zwei Richtungen vollkommen geklärt werden: erstens, welche physikalischen Faktoren beeinflussen in nennenswerter Weise den Ausfall der Jodstärkereaktion, und zweitens, welche Körper mit starker chemischer Affinität zum Jod können in den auf Eiweiß zu untersuchenden Flüssigkeiten nebenher von Einfluß sein? Der letztere Punkt läßt sich auf die Weise entscheiden, daß man die eiweißfreie Flüssigkeit — hergestellt entweder durch Kolloidfiltration oder durch neutrale Ausfällung mit kolloidalem Eisen oder dergleichen — auf jodbindende Körper prüft. Die Methode ist direkt brauchbar für alle Körperflüssigkeiten, wenn derartige Körper entweder nicht vorhanden sind oder sich unter den

gegebenen Verhältnissen so konstant verhalten, daß sie vernachlässigt werden können.

Der Einfluß physikalischer Faktoren ist deshalb von besonderem Interesse, weil die Erforschung dieser Verhältnisse erstens für unsere Methodik von Bedeutung ist, und außerdem auch einen theoretischen Einblick in die komplizierten Verhältnisse bei der Jodstärkereaktion gewährt, die noch immer nicht vollkommen geklärt erscheinen, ob nämlich die Jodstärke eine chemische Verbindung nach festen Proportionen, oder eine feste Lösung nach dem Verteilungssatz ist; wir neigen demgegenüber zu der Auffassung, daß es eine Verbindung ist, deren wechselnder Gehalt an Jod und wechselnde Färbung unter dem Einfluß verschiedener Faktoren durch die verschiedene Löslichkeitsbeeinflussung des Kolloidkomplexes Jodstärke bedingt ist. Wir wollen hier die Tatsachen anführen, die uns lediglich eine derartige Deutung als möglich erscheinen lassen.

Die Stärke gehört zu den durch Temperaturdifferenzen koagulierbaren hydrophilen Kolloiden, und zwar ist diese Koagulation reversibel. Sie unterscheidet sich in dieser Beziehung z. B. wesentlich von dem Eiweiß, das gleichfalls ein hydrophiles Kolloid darstellt und durch Temperaturdifferenzen — aber irreversibel, koaguliert wird. Die Temperatureinwirkung ist bei Stärke ebenso wie bei Gelatine und Agar eine umgekehrte als beim Eiweiß, insofern höhere Temperaturen verflüssigen, also die Löslichkeit erhöhen, niedere Temperaturen koagulieren. Die Stärke kann nun ebenso wie durch Temperatureinflüsse auch durch Krystalloide und Kolloide in ihren Löslichkeitsverhältnissen weitgehend beeinflußt werden; sie kann bei geeigneten Mischungsverhältnissen mit verschiedensten derartigen Körpern entweder ausgeflockt werden oder löslicher werden, da letzteres sich durch eine Abnahme der Viscosität bemerkbar macht.

Für die Beeinflussung der Jodstärkereaktion durch physikalische Einflüsse interessierte man sich aus praktischen Gründen schon sehr frühzeitig; wir wollen hier nicht auf die Literatur näher eingehen, sondern wollen nur das Wichtigste kurz anführen. Fresenius (1857) stellte fest, daß die Jodstärkereaktion bei Erhitzung verschwindet, bei Abkühlen wieder auftritt. Er fand auch gleich, daß sie im reinen Wasser leichter verschwindet, als wenn Säuren oder Salze zugegen sind. Der starke Temperatureinfluß ist aus seinen Angaben ersichtlich, daß

man zu der gleichen Menge Stärkelösung je nach der Temperatur ganz verschiedene Mengen derselben Jodlösung zugeben muß, um eine gleich starke blaue Färbung zu erzielen, und zwar betrugen die Jodmengen bei 0° 0,4, bei 14° 0,7, bei 28° 1,4 ccm. Hieraus kann man schon eins entnehmen, was für uns wichtig ist, daß man ohne besondere Vorsichtsmaßregeln aus der Intensität der Blaufärbung in keiner Weise auf die Menge Jod schließen kann, die mit der Stärke unter Blaufärbung reagiert hat. Die Jodstärkereaktion wird verstärkt, bzw. man braucht kleinere Mengen Jod bis zur Erzielung einer eben deutlichen Blaufärbung, wenn man Salze oder Säuren zugibt. So konnte Fresenius durch Zugabe von Chlornatrium und Salzsäure zur Stärkelösung den Jodnachweis, denn nur darauf kam es ihm an, so weit verfeinern, daß das Jod noch in einer Verdünnung von 1/2 500 000 durch Blaufärbung der Stärke nachgewiesen werden konnte.

Eine befriedigende Erklärung für diese auffallenden Tatsachen konnte man bei dem damaligen Stand der Kenntnisse nicht geben, sie kann nur aus kolloidchemischen Gesetzen hergeleitet werden, und man kann leicht erkennen, daß es sich hier tatsächlich um reine Kolloidbeziehungen abhängig vom Lösungszustand oder Dispersitätsgrad der Stärke, resp. des Jodstärkekomplexes handelt, wenn man die von diesem Forschungsgebiet geläufigen Vorstellungen auf die Verhältnisse der Jodstärkereaktion überträgt, man kann dann auch ohne weiteres voraussagen, wie gewisse Stoffe, z. B. Salze, in bestimmter und zwar entgegengesetzter Weise den Ausfall der Jodstärkereaktion beeinflussen müssen.

Das Gesetz, nach dem die Jodstärkereaktion in ihrer Intensität durch äußere Faktoren beeinflußt wird, lautet ganz einfach so: der verschiedene Grad der Blaufärbung bei gleichbleibenden Mengen Jod und Stärke ist lediglich abhängig vom Lösungszustand (aber im Hinblick auf die Quellung und nicht die Teilchengröße der dispersen Phase) des Kolloidkomplexes Jodstärke, und zwar in dem Sinne, daß eine größere Löslichkeit die Reaktion zum Verschwinden bringt und eine Annäherung an den Zustand der Ausfällung (Entquellung) sie verstärkt.

Dies Gesetz gilt ganz gleichmäßig, ob es sich nun bei diesen äußeren Faktoren um rein physikalische oder mehr chemische Einflüsse handelt. Bei der physikalischen Beeinflussung durch chemische Körper ist es wiederum ganz gleichgültig, ob es sich um Elektrolyte, Nichtelektrolyte, Säuren oder

Basen, um Krystalloide oder Kolloide handelt, sie alle beeinflussen die Jodstärkereaktion, abgesehen natürlich von den Körpern, die momentan eine feste chemische Bindung mit Jod eingehen — in der gleichen Weise, wie sie die Lösungsverhältnisse des Kolloidkomplexes Jodstärke beeinflussen.

Als was hat man sich nun den Komplex Jodstärke vorzustellen, wenn man eine chemische Bindung, die leicht dissoziabel sein soll, oder eine Verbindung nach dem Verteilungssatze ablehnt? Nach den Fällungsreaktionen gegenüber anderen Kolloiden mit ausgesprochener elektrischer Ladung ist die Jodstärke als elektronegatives Kolloid anzusehen. Sein Zustandekommen erklären wir uns so, daß das fast wasserunlösliche Jod durch Jodkali, ebenso wie die Stärke kolloidal gelöst ist, in kolloidaler Lösung wirkt und daß nun die Bildung des Komplexes kolloidales Jod + kolloidale Stärke sich nach den Gesetzen der gegenseitigen Kolloidausflockung vollzieht, wobei zwei Kolloide sich in bestimmten Mischungsverhältnissen gegenseitig ausfällen, bzw. in ihren Löslichkeitsverhältnissen beeinflussen; ganz bestimmt sind aber zum Zustandekommen der Jodstärkereaktion keine Jodionen nötig, wie man dies früher annahm. Die Lösungsverhältnisse des Jods in wäßriger Lösung sind noch recht unklar, wir nehmen aber eine kolloidale Lösung aus folgenden Gründen an: die Löslichkeitserhöhung des Jods durch Jodkali beruht nicht nur auf irgendeiner chemischen Bindung, sondern das Jodkali beeinflußt offenbar, ebenso wie andere Körper, die Löslichkeit des elementaren Jods in physikalischer Weise, (das Jodion nimmt unter den anorganischen Anionen, die die Quellung von Gallerten und Löslichkeit hydrophiler Kolloide begünstigen, neben dem Rhodan und Brom mit die erste Stelle ein), denn erstens fällt das Jod aus konzentrierten Lösungen in Jodkali beim Verdünnen mit Wasser aus und zweitens entspricht die Erhöhung seiner Löslichkeit durch Salze der Löslichkeitsvermehrung anderer Kolloide durch Salze. Außerdem sprechen dafür Erfahrungen, die wir bei Prüfung der desinfektorischen Wirkung von Jod machten, über die wir an anderer Stelle berichten werden. Bei der Desinfektion mit Jod ist bekannt, daß wirkliche Lösungen in anderen Lösungsmitteln als Wasser, also z. B. Schwefelkohlenstoff, die sich auch schon durch die Farbe erheblich unter-

scheiden, kaum noch desinfizierende Wirkung besitzen; diese Wirkung aber in wäßriger Lösung kann durch Zugabe von Salzen, die zweifellos bei ihrer unverkennbaren Beziehung zu Hofmeisterschen (lyotropen) Reihen eine rein physikalische Einwirkung auf den Dispersitätsgrad des Jods in wäßriger Lösung haben, verstärkt oder abgeschwächt werden, ebenso wie dies bekannt ist von der Verstärkung der Phenolwirkung, das unserer Auffassung nach auch ganz zweifellos als Kolloid je nach den Mischungsverhältnissen als eiweißfällend- oder -lösend wirkt und in seiner desinfizierenden Wirkung durch Salze usw. ebenso im Sinne der lyotropen Reihen beeinflußt wird, wie diese Salzwirkungen einen unverkennbaren Zusammenhang mit der Ausfällung des Phenols aus wäßriger Lösung zeigen.

Zur weiteren Erklärung dieser Auffassung der wäßrigen Jod- und Phenollösungen als kolloidaler Lösungen müssen wir noch einiges hinzufügen. An sich stößt diese Auffassung auf gewisse Schwierigkeiten, da z. B. in Wasser „gelöstes" Phenol durch die gebräuchlichen Dialysiermembranen hindurch diffundiert. Dies braucht nicht unbedingt gegen den kolloidalen Charakter der „Lösung" zu sprechen, da wir ja wissen, daß hochkolloidale Körper wie kolloidales Eisen unter gewissen Bedingungen auch durch bestimmte Membranen hindurchtreten können. Wenn wir aber die Löslichkeitsverhältnisse, speziell des Phenols näher ins Auge fassen, so haben wir auf ihre Beziehungen zu lyotropen Reihen schon hingewiesen. Wir können hier nicht ausführlich auf die Bedeutung der lyotropen Reihen für biologische Prozesse und speziell den Desinfektionsvorgang mit Phenol eingehen, wir werden dies in anderem Zusammenhang ausführen. Wir müssen hier nur den Begriff dieser Reihen etwas weiter fassen, als dies gewöhnlich geschieht, und auch anders formulieren, weil es für das Verständnis der kolloidchemischen Vorgänge bei der Jodstärkereaktion von Bedeutung ist. Meist werden nur Salze unter den Begriff der lyotropen Reihen gebracht, die dann hauptsächlich durch ihre Anionen, weniger durch ihre Kationen wirken. Hofmeister unterscheidet nun bei der Beeinflussung der Gelatinequellung und -entquellung in Salzlösungen quellungsfördernde und quellungshindernde Körper. Diese Unterscheidung ist nicht rein durchführbar, da diese Einflüsse von den Mischungsverhältnissen

abhängen und derselbe Stoff sowohl Quellung, als auch in anderer Konzentration Entquellung hervorruft. Die Quellung und Entquellung von Gallerten entspricht, soweit es sich übersehen läßt, vollkommen der Löslichkeitsvermehrung und -verminderung gelöster hydrophiler Kolloide. Diese gegensätzliche Wirkung gilt nun für alle Körper dieser Reihen, gilt auch für Nichtelektrolyte und Kolloide. Man kannte nun früher schon besonders lösungsbefördernde Salze, z. B. Bromkali und Rhodanammonium, die Gelatine auflösen, dasselbe aber auch gegenüber gewissen Bakterien leisten, wie wir nachweisen konnten. Den gleichen Effekt in ebenso starkem Maße zeigt z. B. Harnstoff unter den Nichtelektrolyten. Zu dieser Gruppe gehören auch die von Neuberg als neuer Begriff aufgestellten „hydrotropisch" wirksamen Substanzen, die ebenso wie Bromkali, Rhodansalze und Harnstoff Gallerten gegenüber exzessiv quellungsbefördernde Eigenschaften zeigen, die rein physikalisch auf Anionenwirkung zurückzuführen sind. Wo die Lösungsverhältnisse einer Substanz nun durch derartige Stoffe im Sinne lyotroper Reihen beeinflußt werden, kann man wohl annehmen, daß es sich um kolloidale Lösungen handelt. Wir gewinnen auf diese Weise ein bisher kaum beachtetes Kriterium, das zur Entscheidung dienen kann, ob sich ein Stoff in kolloidaler Lösung befindet oder doch in einem Lösungszustand, der sich dem kolloidalen nähert. Besonders wichtig ist dies Kriterium für solche Körper, die wenig kolloidal sind, eventuell sogar zum Teil mit Wasser echte Lösungen bilden. Dies trifft nun für das Phenol zweifellos zu; durch bestimmte Salze wird das Phenol ausgefällt und seine desinfektorische Kraft dementsprechend erhöht, durch andere Salze seine Löslichkeit erhöht. Diese Salzwirkungen lassen sich mit lyotropen Reihen gut in Einklang bringen. Von Interesse ist für das Phenol die durch Hueppe festgestellte Löslichkeitsbeförderung durch Zusatz von gewissen Salzen: brauchbar war das Natriumsalicylat, dann auch die Salze aller Orthooxybenzoesäuren, sowie der Orthobenzolsulfosäuren und der entsprechenden Naphthalinderivate. Im „Solveol" ist das kreolinsaure Natrium als Lösungsmittel benutzt. Es sind dies alles Stoffe, von denen Neuberg ihre allgemein hydrotropische Wirkung nachwies, die sich außerdem allerdings auch auf die „Wasserlöslichkeit" von fettartigen

Körpern erstreckt. Für das Phenol ist noch ein Punkt von Bedeutung: seine Lösung mit Hilfe von Alkali. Das Phenolnatrium hat exquisit lyotrope Eigenschaften und dient nun dazu, das restierende Phenol in Lösung zu halten. Je mehr Alkali man verwendet, um so stärker ist infolge Bildung von Phenolnatrium die Dispersität des Phenols vermehrt, um so geringer auch dementsprechend seine Desinfektionskraft. Man kann demnach wohl annehmen, daß das Phenol sich in wäßriger Lösung kolloidal gelöst vorfindet; die gleichen Betrachtungen sind auch für die wäßrige Jodlösung übertragbar. In der Lugolschen Lösung wirkt das Jodkali als lyotrope, bzw. hydrotrope Substanz, also die Löslichkeit erhöhend durch physikalische Einflüsse, ebenso wie andere Körper die Löslichkeit des Jods in Wasser im gleichen Sinne erhöhen. Diese Beeinflussung kann nun durch Verdünnung oder durch Mischung mit anderen Kolloiden aufgehoben, eventuell auch verstärkt werden. Ob daneben auch ein Teil Jod und Phenol wirklich in Wasser gelöst ist, können wir nicht entscheiden, darüber müßten wahrscheinlich ultramikroskopische Untersuchungen Aufschluß geben können. Der Unterschied in der Wasserlöslichkeit des Jods gegenüber dem Chlor und Brom liegt darin, daß Jod mit Wasser kein Hydrat bildet, die Löslichkeit ist dementsprechend auch außerordentlich gering; 100 Teile Wasser lösen bei 30^0 nur 0,045 g Jod. Es würde hier zu weit führen, auf den Zusammenhang zwischen Hydratbildung und lyotroper Wirkung näher einzugehen.

Hat nun das Jod in anderen Lösungsmitteln, die echte Lösungen darstellen, keinen desinfizierenden Wert mehr, so verhält sich dies ebenso bei der Erzielung einer Blaufärbung mit Stärke. Eine Lösung von Jod in Chloroform z. B. bewirkt keine Blaufärbung. Wir nehmen daher an, daß das in Wasser kolloidal gelöste Jod mit der Stärke nach denselben Gesetzen sich verbindet, wie zwei Kolloide sich je nach den Mischungsverhältnissen entweder ausfällen, oder wenn eins von beiden, hier wohl immer die Stärke, im Überschuß vorhanden ist, diese Ausfällung aufgehoben und eine Löslichkeitsvermehrung erzielt wird. Was nun die Färbung des Jods mit Stärke und ihren Abbauprodukten betrifft, so ist eine Analogie mit der Farbe von Metallkolloiden auffällig. Die rote Farbe der Verbindung

von Jod mit Dextrin findet sich bei den kleineren (abgebauten) Kolloidkomplexen, die blaue bei den großen. Dies stimmt genau überein mit den Verhältnissen beim kolloidalen Gold, wo die Farbe um so mehr nach rot bis gelbrot tendiert, je mehr das Gold verteilt ist; nach blau, wenn das Gold ausgefällt ist oder doch bereits zu gröberen Komplexen zusammengetreten ist. Auch Lösungen von kolloidalem Silber zeigen einen rötlichen Farbton, wenn die Verteilung eine sehr feine ist.

Die Analogie geht — zufällig — noch weiter: in je verdünnteren Lösungen man das kolloidale Gold durch Reduktion von Goldsalzen entstehen läßt, um so mehr nähert sich die Farbe des Goldsols der rein gelben Farbe der gelösten Goldsalze; ebenso zeigt das Jod durch Jodkali gelöst auch eine gelbe Farbe. Wir haben demnach ganz auffällige Analogien zwischen der Färbung der kolloidalen hydrophilen Jodstärke und des kolloidalen hydrophilen Goldes, die beide elektronegative Kolloide darstellen, parallel der anzunehmenden Teilchengröße (Dispersitätsgrad) der Komplexe, der aber bei der Jodstärke mit dem Quellungszustand dieser verschieden großen Komplexe nicht identisch ist, denn wir haben hier trotz der geschilderten Analogien zwei ganz verschiedene Arten von Kolloiden vor uns. Das Goldsol ist ein hydrophobes Kolloid, d. h. die disperse Phase ist nicht quellbar. Die Stärke ist ein hydrophiles quellbares Kolloid, bei ihr kann man demnach die Größe der Kolloidkomplexe (Jodstärke, Joddextrin) und daneben den Quellungszustand unterscheiden, die Größe bedingt die Farbqualität, der Quellungszustand die Farbintensität. Die blaue Farbe der Jodstärke ist wohl mit Sicherheit auf einen Lösungszustand des Jods zu beziehen, das diese Farbe sowohl in Gasform als auch in anderen Lösungsmitteln zeigt und auch imstande ist, mit anderen Kolloiden als Stärke blaugefärbte Kolloidverbindungen einzugehen, wie z. B. die blaugefärbte Jodcholsäure. Die Farbe der Jod „lösungen" ist zweifellos abhängig von einer Verbindung des Jods mit Molekülen des Lösungsmittels; nur bezeichnen wir bei der Jodstärke die Stärke nicht als eigentliches Lösungsmittel, da wir ja einen Kolloidkomplex annehmen. Den Unterschied kolloidaler Lösungen gegenüber wirklichen Lösungen müßte man dann daran erblicken, daß wirkliche Lösungen einen annähernd gleich-

bleibenden Zustand der Löslichkeit zeigen, während die „Löslichkeit" kolloidaler (hydrophiler) Körper in weiten Grenzen schwankt, was besonders durch Zusatz „lyotroper" Substanzen erzielt werden kann.

Daß nun die Farbe bei einem gewissen Grade des Stärkeabbaus nach Jodzugabe nicht rein rot ist, sondern mehr braun, erklärt sich wohl zum Teil daraus, daß sich hier die gelbe Farbe des Jods zusammen mit der blauen unabgebauter und der roten abgebauter Stärke zu einer schwärzlichen Nuance vereinigt; drängt man die gelbe Farbe durch Herabsetzen der Jodmenge zurück, so erscheint statt dessen ein mehr violetter Ton, also die Mischung von blau und rot. Wir kamen auf diese Verhältnisse der Farbnuancen hauptsächlich zu sprechen, um zu zeigen, daß die Mengen des Jods auch einen Einfluß auf die Farbenqualität, nicht nur auf die Intensität der Färbung haben kann, was ebenfalls von Bedeutung ist, wenn man die Jodstärkereaktion zur quantitativen Bestimmung der Diastasewirkung heranziehen will.

Interessante Aufschlüsse über den Farbenton von Jodlösungen ergaben auch die Untersuchungen von v. Kaufmann und Levite bezüglich der Einflüsse ungleich stark durch Halogen substituierter Kohlenwasserstoffe und über die physikalisch-chemischen Einflüsse auf die Rückverwandlung von Formalin; Stärke in Stärke, auf die wir hier nicht näher eingehen können.

Uns erscheint nach dem Angeführten am einfachsten, die Jodstärkereaktion ihrem Wesen nach als Verbindung zweier Kolloide aufzufassen, danach erklärt sich auch der überraschend wechselnde Jodgehalt der Jodstärke viel besser als durch die Annahme einer chemischen Verbindung oder einer Lösung nach dem Verteilungssatz.

Interessiert uns nun auch die Art des Zustandekommens des Jodstärkekomplexes weniger für die Methode der Eiweißbestimmung, so ist doch zweifellos, daß die Beeinflussung der Farbintensität durch verschiedene Faktoren rein kolloidchemischen Gesetzen folgt. Wir wollen hier nur noch ganz kurz ausführen, was als Beweis hierfür angesehen werden kann.

Wir haben bereits gesehen, daß die Blaufärbung durch

Erwärmen zum Verschwinden gebracht, durch NaCl und Säure verstärkt werden kann, von den jodbindenden Körpern können wir hier absehen. Es lassen sich nun noch eine ganze Menge anderer Körper auffinden, die den Ausfall der Farbreaktion verstärken oder abschwächen gegenüber der Farbintensität, die in reinem Wasser erzielt wird. Um uns nicht in unnütze Einzelheiten zu verlieren, können wir das Ergebnis unserer Versuche dahin zusammenfassen, daß man z. B. bei der Einwirkung von Salzen wieder die Hofmeistersche Reihe der Anionen wirksam findet, wie sie dieser bei der Entquellung und Quellung von Gelatine in Wasser oder in Salzlösungen aufdeckte. Auch die Kationenwirkung entspricht einer ähnlichen Reihe.

Auch hier folgen die Erscheinungen nicht rein dem Gesetz lyotroper Reihen, wie sie Hofmeister aufstellt, d. h. die einzelnen Körper beeinflussen den Kolloidkomplex nicht einseitig, ebenso wie wir darauf hinwiesen, daß bei der Quellung von Gelatine in Salzlösungen die Salze sich nicht in quellungsfördernde und -hindernde trennen lassen, gegenüber der Quellung in reinem Wasser, sondern jeder Körper kann je nach Konzentration eine positive und negative Wirkung haben im Sinne der Löslichkeitsvermehrung, wobei nur wichtig ist, daß die Breite der positiven und negativen Zone sehr verschieden entwickelt sein kann, so daß die eine Reihe von Körpern mehr als löslichkeitsfördernd erscheinen, die anderen umgekehrt. Auch die Ausdehnung der lyotropen Reihen auf Nichtelektrolyte, z. B. Harnstoff, sowie auf die hydrotropischen Substanzen und kolloidale Körper zeigt bei der Beeinflussung der Jodstärkereaktion durchweg die gleichen Resultate, wie wir das von der Einwirkung bei anderen kolloidchemischen Vorgängen kennen. Es würde uns zu weit führen, hier noch die Bedeutung und mögliche Erklärung der sogenannten „Übergangsreihen" zu entwickeln; wir müssen uns dies für eine andere Gelegenheit versparen.

Jedenfalls glauben wir genügend Material dafür beigetragen zu haben, um behaupten zu können:

1. Die Jodstärke verdankt ihre Entstehung nicht einer chemischen Verbindung oder einer festen Lösung von Jod in Stärke. Sie ist eine Adsorptionsverbindung, bei der ganz ver-

schiedene Proportionen vorkommen können, entstanden aus der gegenseitigen Ausfällung (oder sonstiger Löslichkeitsbeeinflussung) der beiden kolloidalen Lösungen Jod und Stärke.

2. Die Intensität der Blaufärbung des elektronegativen Kolloidkomplexes Jodstärke ist, wo es sich nicht um chemische Bindung des Jods durch andere Körper handelt, abhängig vom Quellungszustande, chemisch indifferente Körper wirken im Sinne lyotroper Reihen in der erweiterten Fassung.

Aus dem Resultat dieser Untersuchungen kann man leicht entnehmen, welche Kontrolluntersuchungen man vorzunehmen hat, wenn man die Intensität der Jodstärkereaktion als Indicator für eine colorimetrische Eiweißbestimmung verwenden will. Wenn sich auch bei näherer Analyse die Verhältnisse als sehr kompliziert herausgestellt haben, so scheint trotzdem kein Hindernis zu bestehen, diese Methode auf die Untersuchung von Serum und Liquor zu übertragen. Bei unseren bisherigen Untersuchungen, teils an normalen und pathologischen Liquoren, teils an Serum und Plasma immunisierter Tiere, trat keins der erwähnten Verhältnisse hindernd in die Erscheinung. Nicht eiweißartige Körper, die die Jodbindung in unkontrollierbarer Weise beeinflussen könnten, sei es durch chemische Bindung, sei es durch physikalische Beeinflussung, scheinen in wechselnder Menge nicht vorhanden zu sein.

Wenn man bei Immunitätsprozessen, besonders natürlichen und künstlichen Infektionen an Versuchstieren, den Eiweißgehalt im Blut verfolgen will, so empfiehlt sich wohl im allgemeinen, nicht das Serum, sondern das Plasma zur Untersuchung heranzuziehen, worauf schon Langstein und Meyer hingewiesen haben. Wir konnten bei Versuchstieren im Laufe von Immunisierungen das Ansteigen des Eiweißgehalts im Plasma und Serum mit Hilfe der Jodstärkemethode eher feststellen als mit irgendeiner anderen Methode, die bisher zur Feststellung des Gesamteiweißes angewendet wurde. Auch im Liquor konnten wir Differenzen im Eiweißgehalt verschiedener Liquoren feststellen, wo die anderen Methoden versagten.

Es fragt sich nun, welche Methode der Eiweißjodierung für unsere Zwecke am meisten geeignet ist. Es lassen sich mit etwas komplizierterer Technik Methoden ausarbeiten, die ganz außerordentlich feine Differenzen erkennen lassen und

auch in Doppelbestimmungen vollkommen übereinstimmende Resultate ergeben, wobei sich alle Fehlermöglichkeiten ausschalten lassen, die etwa durch Beimengung anderer jodbindender oder die Intensität der Färbung beeinflussender Substanzen hervorgerufen werden könnten. Es handelt sich bei Auswahl der möglichen Methoden um zwei Fragen, erstens ob man die Jodierung des Eiweiß einer Flüssigkeit nach Isolierung desselben vornehmen will, oder ob man das Jod zu Serum, Liquor oder dergleichen direkt zugibt, zweitens in welcher Weise die Bindung des Jods am besten vorgenommen wird.

Wir wollen gleich vorwegnehmen, daß es uns nach unseren bisherigen Untersuchungen für Serum resp. Plasma und Liquor am besten erscheint, die Jodlösung zu den Körperflüssigkeiten, eventuell nach passender Verdünnung zuzugeben und dann 30 Minuten im Wasserbad von 40^0 einwirken zu lassen, worauf man Stärke zugibt und die entstandene Farbintensität mit einer Testskala vergleicht, auf die wir gleich noch zu sprechen kommen werden.

Als Maß des Eiweißgehalts gilt die Menge Jod, die bei der gewählten Versuchsanordnung gebunden ist, was sich dadurch kenntlich macht, daß keine Bläuung mehr mit Stärke eintritt.

Im Eiweißmolekül ist es nach den bisherigen Untersuchungen zweifellos der aromatische Kern, der das Jod schon bei gewöhnlicher Temperatur in kürzester Zeit bindet. Bei dem verschiedenen Gehalt verschiedener Eiweißarten an Aminosäuren mit aromatischem Kern müssen dem entsprechend auch verschiedene Eiweißkörper verschiedene Mengen Jod binden, also eine verschiedene „Jodzahl“ besitzen. Man könnte diese Jodzahl der Eiweißkörper zu ihrer Charakteristik zu verwenden versuchen und muß annehmen, daß Körperflüssigkeiten bei gleichem Eiweißgehalt, der etwa durch Ausfällen und Wägen festzustellen wäre, verschiedene Mengen Jod binden könnten, doch sind diese Unterschiede zu klein, um einerseits eine scharfe Differenzierung verschiedener Eiweißkörper zu ermöglichen oder andererseits die Eiweißbestimmung mittels Jod in methodischer Hinsicht fehlerhaft zu gestalten, besonders da es uns ja bei der Untersuchung von Blut und Liquor im wesentlichen auf die Feststellung möglichst feiner Differenzen, nicht

auf den absoluten Eiweißgehalt ankommt. In geeigneten Fällen könnte für eiweißdiagnostische Untersuchungen aber auch dieser Jodzahl Bedeutung zukommen, man müßte dann etwa den Quotienten $\frac{\text{N-Gehalt}}{\text{Jodzahl}}$ bestimmen, was sich natürlich nicht nur für rein dargestellte Eiweißkörper, sondern auch z. B. für verschiedene durch Ausfällung gewonnene Serumfraktionen durchführen ließe.

Für unsere Untersuchungen über den Gesamteiweißgehalt von Blut und Liquor glaubten wir diesen Faktor vernachlässigen zu können; er spielt ja auch bei anderen Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung in diesen Körperflüssigkeiten eine gewisse Rolle, z. B. bei der Methode von Roberts-Brandberg, wo als Maß des Eiweißgehalts die Endverdünnung dient, die eben noch bei der Hellerschen Probe eine Ringbildung erkennen läßt. Auch hier ergeben verschiedene Eiweißkörper eine verschiedene Endverdünnung, ohne daß hierdurch der Wert der Methode wesentlich herabgesetzt würde. Dieser Fehler haftet fast allen Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung an mit Ausnahme der Bestimmung durch Wägung, doch ist diese Methode auf der anderen Seite mit so viel Unzuträglichkeiten (Verwendung größerer Mengen Untersuchungsmaterial) und Ungenauigkeiten (Mitfällung anderer Körper, die durch Auswaschen mit heißem Wasser nicht fehlerfrei entfernt werden können, da das koagulierte Eiweiß hierin nicht vollkommen unlöslich ist) belastet, daß beide Arten der Untersuchung vorläufig wohl nebeneinander ihre Berechtigung behalten werden. Auch der refraktometrischen und allen anderen Methoden der Eiweißbestimmung haften Fehler an, die sich vorläufig nicht ausschalten lassen. Es gibt eben keine absolut genaue Eiweißbestimmung in Blut oder Liquor, und außerdem soll hierbei noch der Forderung genügt werden, mit einer möglichst einfachen Apparatur und Versuchsanordnung bei genügender Ausschaltung subjektiver Momente auszukommen.

Es ergab sich nun bei unseren Untersuchungen, daß im Verhältnis zum Serum der Liquor mehr Jod bindet, als dem relativen Eiweißgehalt entspricht, wenn man die Jodlösung einfach zu der unvorbehandelten Körperflüssigkeit zugibt. Ergeben sich nun dadurch Schwierigkeiten, die Jodzahl in absolute

Mengen Eiweiß umzurechnen, so halten wir dies Verfahren trotzdem für das beste, wenn man mit möglichst einfacher Versuchsanordnung auskommen will. Den Unterschied im Liquor führen wir auf den Einfluß der Carbonate zurück, die bei dem geringen Eiweißgehalt einen größeren Einfluß auf den Jodierungsprozeß ausüben. Der Liquor reagiert auch im Gegensatz zum Serum gegen Lackmuspapier schwach alkalisch.

Man kann diese Differenzen ausschalten, wenn man den Liquor oder passend verdünntes Serum mit der 4- bis 10fachen Menge absoluten Alkohols oder Aceton in einem Zentrifugenglas ausfällt, abzentrifugiert, die alkoholische Lösung abschüttet und nun das Eiweißsediment wieder auflöst. Da das koagulierte Eiweiß sich bei dieser Methode nicht leicht restlos in Wasser oder auch Kochsalzlösung auflöst, besonders wenn es sich um größere Mengen handelt, fügt man zur Lösung geringe abgemessene Mengen Säure oder Alkali zu und jodiert nun. Man kann Schwefelsäure nehmen und jodiert dann nach Hofmeister unter Zufügen von Kaliumjodat oder bei schwach essigsaurer Reaktion nach Hopkins und Pinkus. Alle diese Zusätze sind mehr darauf berechnet, eine möglichst totale Jodierung des Eiweißes bis zur vollkommenen Sättigung herbeizuführen, sie beeinflussen aber den Ausfall der Jodstärkereaktion, und zwar in verschieden starker Weise, da bei verschiedenem Eiweißgehalt auch verschiedene Mengen des zugesetzten Alkalis oder der Säure gebunden werden. Dies Moment kann bis zu einem gewissen Grade vernachlässigt werden, da unter gleichen Versuchsbedingungen schließlich doch die Menge gebundenen Jods in einem festen Verhältnis zur Menge des vorhandenen Eiweißes steht; nur sind diese Mengen in verschiedenen Konzentrationen nicht absolut proportional.

Für den Liquor und Blut ziehen wir deshalb vor, bei originaler Reaktion ohne jeden Zusatz zu jodieren. Anders liegen dagegen die Verhältnisse, wenn man die Eiweißbestimmung mittels Jod zur Feststellung des Eiweiß- oder Bakteriengehaltes einer Vaccine verwenden will, worauf wir noch zu sprechen kommen.

Die Jodierung des Eiweißes, gleichgültig ob dasselbe vorher isoliert wurde oder z. B. Serum direkt jodiert wird, nehmen wir so vor, daß wir 30 Minuten im Wasserbad von 40° eine

Jodlösung einwirken lassen, die man sich durch passende Verdünnung aus einer $^{n}/_{10}$-Jodlösung herstellt.

Bei diesen Versuchen ist darauf zu achten, daß das Jod sehr flüchtig ist; es muß demnach die Vorratsflasche mit der $^{n}/_{10}$-Jodlösung stets gut verschlossen gehalten und vor jedesmaliger Entnahme durchgeschüttelt werden; die daraus hergestellten Verdünnungen darf man nur kurze Zeit benutzen. Die Jodierung im Wasserbad nehmen wir stets in gleich großen Reagensröhrchen vor. Auf kleine Differenzen kommt es natürlich nicht an, nur kann es sehr wohl einen Unterschied ausmachen, ob man in einem Reagensglas mit hoher Schicht und kleiner Oberfläche oder in einem Becherglas mit geringer Schichthöhe und großer Oberfläche jodiert, wo dem Jod reichlicher Gelegenheit zum Verdunsten gegeben ist. Wir wählen deshalb auch die Versuchsdauer von 30 Minuten, damit nicht allzuviel Jod verdunstet, denn wir können ja nicht das ans Eiweiß gebundene Jod direkt bestimmen, wir bestimmen nur das in der Flüssigkeit restierende ungebundene Jod; nach 30 Minuten ist das Eiweiß keineswegs restlos jodiert, aber Differenzen sind nach dieser Zeit kaum festzustellen.

Will man nun die jodbindende Fähigkeit des Serums bestimmen, so kann man hier, wo meist größere Mengen zur Verfügung stehen, einen anderen Weg einschlagen als beim Liquor, wo man gezwungen ist, mit möglichst geringen Mengen für eine Untersuchung auszukommen.

Das Serum verwendeten wir meist in einer Verdünnung von $^{1}/_{10}$ und gaben zu gleichen Mengen dieser Serumverdünnung fallende Mengen Jodlösung in möglichst enger Reihe. Es wurde dann die Mischung, die auf gleiches Volumen gebracht wurde, 30 Minuten bei 40° gehalten und dann 0,5 ccm einer 1°/₀igen Lösung von löslicher Stärke Kahlbaum zugegeben, die vorher auf 40° angewärmt wurde und täglich neu hergestellt war. Wir bekamen dann eine abfallende Reihe von verschiedenen blauen Farbtönen, angefangen von einer undurchsichtigen blauen Farbe über hellblau, weißblau, bis endlich in der Reihe ein Röhrchen kommt, wo durch Stärkezugabe überhaupt keine Spur von Blaufärbung mehr erzielt wird. Dieser Grenzwert läßt sich sehr genau bestimmen. Als Maß der jodbindenden Fähigkeit einer Serumverdünnung, die dem Eiweißgehalt ent-

spricht, dient dann einfach die Menge einer verdünnten Jodlösung in Bruchteilen eines Kubikzentimeters, die vollkommen gebunden wurde (in 30 Minuten bei 40°); dies ist kenntlich an der negativen Reaktion mit Stärke.

Für das Serum resp. Plasma gestaltet sich demnach das Verfahren äußerst einfach. Wir wollen gleich hinzufügen, daß wir auf diese Weise so geringe Differenzen im Verdünnungsgrade eines Serums feststellen konnten, wie sie mit keiner anderen Methode quantitativer Eiweißbestimmung mehr zu erfassen waren. Eine Differenz von ca. 0,01 ‰ Eiweiß läßt sich ohne Verwendung eines Colorimeters nachweisen.

Will man für Doppelbestimmungen genau übereinstimmende Resultate haben, so stellen sich gewisse Schwierigkeiten ein, die aber jeder Methode von so außerordentlicher Feinheit anhaften müssen, nämlich die Differenzen, die sich durch ungenaue Abmessung ergeben. Wollte man mit den gewöhnlichen käuflichen Pipetten von 1 ccm, die auf $^1/_{100}$ eingestellt sind, etwa eine Verdünnung von Serum herstellen, so bekommt man bei Verwendung verschiedener Pipetten immer gewisse kleinere oder größere Differenzen, die sich entweder dadurch vermeiden lassen, daß man möglichst große Mengen durch Pipettieren abmißt, oder indem man die Verdünnung durch Wägung herstellt. Die Serummenge wiegen wir dabei in einem Glasröhrchen ab, das an jedem Ende zu einer Capillare ausgezogen ist. Dieses Röhrchen wird dann mit Hilfe einer Saugvorrichtung entleert, mehrmals durchgespült und der Inhalt durch Wägung auf den gewünschten Verdünnungsgrad gebracht. Auf diese Weise lassen sich alle durch Abmessung bedingten Fehlermöglichkeiten in genügender Weise ausschalten, doch halten wir für gewöhnlich das Verdünnen mittels geeichter Pipetten für ausreichend, wenn es sich nicht etwa in einem besonderen Fall um Feststellung ganz besonders feiner Differenzen handeln sollte.

Will man den Einfluß anderer Substanzen von variablem Gehalt als Eiweiß auf den Ausfall der Jodstärkereaktion ausschalten, was uns bei unseren bisherigen Untersuchungen aber unnötig erschien, so kann man das Ultrafiltrat des Serums mit Jod binden lassen und die dadurch etwa entstehenden Differenzen bei der Berechnung der Eiweißjodzahl in Rechnung

setzen. Man hat dann auf jeden Fall rein die Jodmenge, die nur mit dem Eiweiß, resp. mit den kolloidalen Körpern reagiert hat.

Abgesehen nun von den Verfeinerungsmöglichkeiten, die für gewisse Zwecke eventuell von Bedeutung sein könnten und eine etwas kompliziertere Versuchsanordnung nötig machen, gestaltet sich die Eiweißbestimmung im Serum äußerst einfach und ist in jedem Laboratorium von dem Ungeübtesten mit wenig Arbeitsaufwand auszuführen, die Ablesung ist kaum noch als subjektiv zu bezeichnen. Bei der großen Feinheit macht es auch kaum einen Unterschied, ob das eine oder andere Röhrchen noch als spurweise blau bezeichnet wird. Dieser Endwert ist außerordentlich viel leichter zu erkennen, als etwa die eben noch sichtbare Bildung eines Ringes bei Unterschichtung mit Salpetersäure.

Da verschiedene Stärkesorten einen etwas verschiedenen Ausfall der Reaktion bedingen können, der aber bei Verwendung des gleichen Präparats und sorgfältiger Herstellung vernachlässigt werden kann, kann man auch für das Serum das gleiche, oder ein ähnliches Verfahren anwenden, wie wir es für die Eiweißbestimmung im Liquor als geeignet fanden.

Die Untersuchung macht deshalb eine andere Versuchsanordnung nötig, weil wir hier auf äußerste Materialersparnis angewiesen sind. Da der Liquor gegenüber dem Serum einen äußerst geringen Eiweißgehalt besitzt (ca. 0,2 $^0/_{00}$), so fällt auch die Verdünnung weg. Um die bei der Serumuntersuchung angegebene Untersuchungsreihe zu umgehen, müssen wir also versuchen, mit einem Einzelversuch auszukommen; das läßt sich auch bis zu einem gewissen Grade durchführen.

Man versetzt 0,5 ccm Liquor mit einer passenden Menge ca. $^n/_{200}$-Jodlösung, die man variieren kann, eventuell je nach dem Ausfall einer vorher angestellten anderen Eiweißreaktion (Nonne, Roberts, Brandberg, Goldreaktion). Weiß man, daß der Eiweißgehalt erhöht ist, so nimmt man gleich eine entsprechend höhere Jodmenge.

Die Jodmenge ist bei normalem, oder annähernd normalem Liquor so zu bemessen, daß nach 30 Minuten Bindung im Wasserbad von 40^0 eine Blaufärbung erzielt wird, die der einzelne Untersucher sich am besten durch Vorversuche be-

stimmt. Einerseits muß die Jodmenge möglichst groß sein, um bei einer genügend starken Eiweißvermehrung noch eine Blaufärbung zu erzielen, andererseits muß die Jodmenge so gering sein, daß die Farbnuance, die bei Verwendung eines ganz normalen Liquors erzielt wird, nicht so stark ist, daß feinere Differenzen nicht mehr erkennbar sind. Dies kann, wie gesagt, vorher bestimmt werden, wenn man daneben irgendeine andere Eiweißreaktion benutzt, was man ja bei Untersuchung des Liquors stets tun wird.

Wir müssen nun noch auf irgendeine Weise bestimmen, welche Menge Jod durch 0,5 ccm Liquor gebunden worden ist. Wir haben uns lange bemüht, eine haltbare Farblösung zu finden, die als Standard für den Vergleich mit normalem Liquor zu gebrauchen wäre, keine der verwendeten bequem reproduzierbaren Standardflüssigkeiten entsprach in genügender Weise dem Farbton der Jodstärkereaktion.

Es ist aber auch auf diese Weise nicht der Faktor auszuschalten, den die jedesmal neu herzustellende Stärkelösung auf das Zustandekommen der Blaufärbung ausübt; dieser Faktor ist zwar gering, wird doch aber besser ausgeschaltet. Man kann dies auf sehr einfache und bequeme Weise erreichen, indem man sich aus der jeweils verwendeten Stärkelösung durch Zugabe genau abgestufter Jodmengen eine Skala verschiedener Blaufärbungen herstellt. Hält man diese Reihe unter den gleichen Bedingungen, in unserem Falle also, läßt man die Reaktion nach Erwärmen auf 40° eintreten, so erkennt man am Grade der Blaufärbung, wieviel Jod unter den gleichen Mischungsverhältnissen einer bestimmten Blaufärbung entspricht; man kann auf diese Weise nun auch feststellen, wieviel Jod von der ursprünglich zu einer Eiweißlösung zugegebenen abgemessenen Menge nach einer bestimmten Bindungszeit übrig geblieben ist. Stimmt also die mit einem Liquor nach Bindung erzielte Jodstärkereaktion mit einem Röhrchen der Testskala von bekanntem Jodgehalt überein, so ist die Differenz zwischen dieser Menge im Teströhrchen und der ursprünglich zugegebenen Jodmenge die Jodzahl des betreffenden Liquors.

Die Testskala verschieden starker Jodreaktionen stellt man sich am besten so her, daß man etwas größere Mengen Stärke-

und Jodlösung verwendet, um genügend feine Abstufungen zu erzielen.

Wir erreichen mit dieser Methode bei Verwendung einer einzigen Verdünnung der zu untersuchenden Körperflüssigkeit ungefähr das gleiche, was wir im Serum mit einer Verdünnung erzielen.

Ist der ungefähre Eiweißgehalt des Liquor durch einen Vorversuch mit anderer Methode bekannt, so gelingt es bei einiger Übung leicht, die Jodmenge in jedem Fall so zu bemessen, daß nach 30 Minuten Bindung bei 40^0 eine Blaufärbung bei der Jodstärkereaktion zustandekommt, die sich auf die oben geschilderte Weise in die Eiweiß„jodzahl“ des Liquors umrechnen läßt.

Andererseits kann es beim Liquor aber auch besonders erwünscht erscheinen, nicht die absolute Eiweißmenge festzustellen, sondern nur eine Erhöhung über den normalen Eiweißgehalt, der als sehr konstant angesehen werden kann. Es kann nicht oft genug betont werden, eine wie außerordentliche Bedeutung dieser Feststellung bei den verschiedensten Krankheiten, besonders aber bei Lues, zukommt. Kommt es nur auf diese Feststellung an, so kann man eine jedesmal gleichbleibende Menge Jod zu einer abgemessenen Liquormenge zugeben, so daß bei normalem Eiweißgehalt eine eben noch erkennbare Blaufärbung eintritt. Man kann dann die Mischungsverhältnisse so einstellen, daß sich die geringste krankhafte Eiweißvermehrung, wie sie sich durch keine andere Methode feststellen läßt, durch ein Ausbleiben der Jodstärkereaktion deutlich macht.

Wir haben schon darauf hingewiesen, daß die Jodzahl für Serum und Liquor nicht einem genau gleichen Eiweißgehalt entspricht, wenn man die Körperflüssigkeiten ohne besondere Zusätze jodiert, dies spielt aber praktisch unseres Erachtens keine Rolle, da diese Jodzahlen trotzdem für den Eiweißgehalt beider Körperflüssigkeiten gute Vergleichswerte ergeben.

Wir wollen hier nicht auf Vergleichswerte eingehen und uns in diesem Zusammenhang darauf beschränken, die Methode der Eiweißbestimmung mit der Jodstärkereaktion zu begründen und auf ihre verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten hinzudeuten.

Wir haben nun diese Methode der Eiweißbestimmung auch übertragen auf die Standardisierung von Bakterienvaccinen. Die einfacheren Methoden der Gehaltsbestimmung von Bakterienvaccinen leiden sämtlich an starker Ungenauigkeit. Die meistübliche Methode der Abmessung von Bakterien in Form eines feuchten Rasens durch geeichte Normalösen oder gar die Umrechnung von bewachsenen Schrägröhrchen oder Kolleschalen auf eine bestimmte Bakterienmasse kann in keiner Weise feineren Ansprüchen genügen. Bei der Methode der Bakterienzählung in Zählkammern oder gar bei der Zählung nach Wright ist die Fehlerquelle ebenfalls sehr groß infolge der enorm starken Verdünnung und des sehr hohen Faktors, mit dem die erhaltenen Zahlenwerte multipliziert werden müssen; außerdem sind stets, je nach dem Alter der Kultur, schon verschiedene Mengen Bakterien aufgelöst, die durch Zählung nicht erfaßt werden können. Wir werden auf einen Vergleich der verschiedenen zu Gebote stehenden Methoden eventuell an anderer Stelle eingehen und wollen hier nur darauf hinweisen, daß absolute Werte nur zu erhalten sind durch Vergleichzahlen, die sich auf getrocknete Bakterien beziehen, außerdem muß der Eiweißanteil der bereits durch Autolyse gelösten Bakterien mit berücksichtigt werden. In ausreichend exakter Weise kann dieser Forderung genügt werden, wenn man den Stickstoffgehalt einer genügend großen Menge Vaccine bestimmt und auf den etwas verschiedenen Stickstoffgehalt der jeweils verwendeten Bakterien umrechnet. Man kann auf diese Weise feststellen, welchem Gehalt an Bakterientrockensubstanz eine Vaccine entspricht. Da der Stickstoffgehalt von Vaccinen relativ gering ist, so ist diese Methode bequem nur anwendbar bei der Herstellung von Impfstoffen im großen, wo ein Verlust etwas größerer Mengen für diese Untersuchung nicht ins Gewicht fällt. In der gewöhnlichen Vaccinepraxis empfehlen sich außer den diaphanometrischen Verfahren, auf die wir hier nicht näher eingehen wollen, vor allem die Methoden, die eine direkte Eiweißbestimmung der vorhandenen Bakterien bezwecken. Die Stickstoffbestimmung dient ja auch diesem Zwecke, wenn auch auf indirektem Wege. Wenn es auch colorimetrische Methoden gibt, die die Feststellung des Bakteriengehaltes einer Vaccine ohne vorherige Auflösung der Bak-

terien gestatten, so sind doch alle diese Methoden recht ungenau; dasselbe trifft auch zu für die Eiweißbestimmung in ungelösten Vaccinen mit Jodstärkereaktion.

Hier muß nun auf einen prinzipiellen Unterschied der Eiweißbestimmung mit Jod gegenüber anderen Methoden hingewiesen werden, der eventuell auch für andere Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode von Bedeutung sein kann. Während z. B. die Eiweißbestimmung mittels Formoltitration nach Sörensen vom Grade des Eiweißabbaues abhängt und deswegen auch eine besonders geeignete Methode ist, um diesen Abbau quantitativ zu verfolgen, scheint das Jodbindungsvermögen der Eiweißkörper in weitestem Grade davon unabhängig zu sein. Das Eiweißmolekül wird einerseits bei der Einwirkung des Jod schon in Teile gespalten, andererseits wird das Jod im aromatischen Kern der das Eiweiß bildenden Aminosäuren gebunden, so daß die Aminosäuren praktisch ungefähr das gleiche Jodbindungsvermögen haben werden wie genuines Eiweiß. Wir können deshalb die „Jodzahl" von Eiweiß oder von eiweißhaltigen Zellen ebensogut am genuinen Eiweiß bestimmen, als etwa an den durch Säurehydrolyse oder dergleichen Eingriffe gewonnenen Spaltprodukten.

Wir haben die Standardisierung von Bakterienvaccinen nur als ein Beispiel herausgegriffen, um zu zeigen, wie man die Jodstärkereaktion zur Eiweißbestimmung auch in Fällen benutzen kann, wo der Eiweißbestimmung eine eiweißaufschließende Methode vorangehen muß. Zur Auflösung von Bakterien jeder Art stehen uns nun nach unseren eigenen Untersuchungen eine ganze Anzahl verschiedener Methoden zur Verfügung, die teils das Eiweiß vollkommen unverändert lassen, teils dasselbe mehr oder weniger tiefgehend verändern; wir wollen hier auf diese Methoden nicht näher eingehen. Für uns ist hier nur die Tatsache von Bedeutung, daß eine Spaltung des Eiweißes bei einem derartigen Aufschluß von Bakterien zwecks jodometrischer Eiweißbestimmung gleichgültig ist, nur muß der Einfluß der zwecks Aufschließung zugegebenen Körper auf den Ausfall der Jodstärkereaktion berücksichtigt werden, was ja durch stets gleichbleibende Versuchsanordnung in genügendem Maße gewährleistet wird. Man kann dementsprechend etwa die Bakterien durch Erhitzen mit

Säure auflösen und dann bei saurer Reaktion eventuell unter Zugabe von Katalysatoren (z. B. Eisenchlorid) jodieren und dann das gebundene Jod auf die schon geschilderte Weise bestimmen.

Die angeführten Beispiele mögen genügen, um die Verwendungsmöglichkeit und die Art der Durchführung einer quantitativen Eiweißbestimmung mittels Jodstärkereaktion zu demonstrieren. Wir beabsichtigen über die beim Liquor erhaltenen Resultate, sowie über den Vergleich mit anderen Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung noch eingehend zu berichten, und wollen hier zum Schluß nur noch kurz auf die Verhältnisse im Blut eingehen, soweit sie für die Methode im allgemeinen von Interesse sind. Gerade hier glauben wir für das Studium der Immunitätsvorgänge von der quantitativen Untersuchung des Eiweißgehaltes manchen Aufschluß erwarten zu können.

Ein Beispiel möge dies illustrieren, nämlich die Untersuchung der Verhältnisse bei der Wa.-R. Es ist bekannt, daß der Reaktionskörper, der den positiven Ausfall der Wa.-R. in Körperflüssigkeiten bedingt, an Leberzellen gebunden werden kann. Es ist nun von Interesse, die Veränderungen zu analysieren, die durch diese Art der Behandlung im luetischen Serum hervorgerufen werden. Späth kommt z. B. auf Grund seiner Untersuchungen mit der Goldreaktion am Liquor zu der Schlußfolgerung, daß die Goldreaktion und damit parallel der Ausfall der Wa.-R. nicht an Eiweißkörper gebunden sein kann, da die Paralysereaktion eines Liquors mit kolloidalem Gold nach Behandlung mit gekochter Leber verschwindet, ohne daß der Eiweißgehalt verändert ist. Diese letztere Behauptung wäre nun für die Deutung des Wesens der Wa.-R. von außerordentlicher Bedeutung, es läßt sich aber nachweisen, daß dies nicht der Fall ist. Wäscht man gekochte Leber so lange aus, daß das Waschwasser nicht mehr eiweißhaltig ist und bindet luetische Seren mit einer feinen Emulsion derartiger Leber, so kann man selbst im Serum nach Abzentrifugieren der Leber feststellen, daß das Jodbindungsvermögen herabgesetzt ist gegenüber einer Serumverdünnung, die in den gleichen Mischungsverhältnissen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt wurde. Die tatsächliche Herabsetzung des Jodbindungsver-

mögens ist noch größer, als sie bei dieser Versuchsanordnung zutage tritt, da das mit dem gleichen Volumen Leberemulsion versetzte Serum ja tatsächlich infolge des Volums der Leberpartikelchen, die ungelöst bleiben, nicht so stark verdünnt wurde, wie der mit Kochsalzlösung verdünnte Kontrollversuch. Da die Serumlipoide bei der gewählten Versuchsanordnung kaum von Einfluß sein können, muß man dies Sinken der Jodzahl wohl unbedingt auf eine Bindung von Serumeiweiß an die Leberpartikelchen auffassen, der Eiweißgehalt ist also durch die Behandlung mit Leber herabgesetzt.

Zeigt dieses Untersuchungsresultat nun, wie möglichst fein ausgebaute Methoden quantitativer Eiweißbestimmung für die Analyse von Immunvorgängen herangezogen werden können, so kommt dieser Untersuchung bei Immunitätsvorgängen insofern eine ganz allgemeine Bedeutung zu, als sie anscheinend ausnahmslos zu Veränderungen des Eiweißgehaltes des Blutes führen, die recht beträchtliche Grade erreichen können. Für die Auffassung, die wir uns von den Immunkörpern bilden müssen, ist diese Tatsache jedenfalls von erheblicher Bedeutung, insofern ein starkes Ansteigen des Eiweißgehaltes im Blute wenig vereinbar ist mit der Annahme, daß den Immunitätskörpern ein reiner Fermentcharakter zukomme. Wie weit bei Infektionskrankheiten und bei Immunisierungen auch Herabsetzungen des Eiweißgehaltes im Blute vorkommen und ob dies einen in gewissen Stadien regelmäßig zukommenden Befund darstellt, können wir nach unseren bisherigen Untersuchungen noch nicht sicher entscheiden. Sicher ist dagegen, daß alle Immunseren mit hohem Titer, die durch künstliche Immunisierung erzielt sind, einen mehr oder minder erhöhten Eiweißgehalt im Serum zeigen. Dies trifft bei allen präcipitierenden Seren zu, wie wir schon eingangs erwähnten, auch für agglutinierende Seren und z. B. für Diphtherieheilserum.

Für eine feinere Analyse der hier in Frage kommenden Vorgänge genügt aber eine Untersuchung des Serums nicht, wie dies auch schon frühere Untersuchungen nachwiesen; einen genaueren Einblick in die Verhältnisse des Gesamteiweißes gewährt nur die Untersuchung des Blutplasmas. In den letzten Jahren haben die Untersuchungen über die Verteilung von Immunkörpern auf die verschiedenen Eiweißfraktionen des

Serums etwas genaueren Einblick in diese Verhältnisse geschaffen. Bei unseren früheren Untersuchungen über die Bedeutung der Salze für die spezifische Agglutination konnten wir auch nachweisen, daß das Agglutinin verschiedenen Eiweißfraktionen des Serums angehört, dasselbe ist ja auch vom Komplement bekannt. Daß nun diese Immunkörper — nachweisbar durch ihre spezifische Wirkung — identisch seien mit den Eiweißkörpern des Normalserums, mit denen sie gleiche Ausfällung und Löslichkeit zeigen, ist damit nicht etwa bewiesen; wir nehmen also keineswegs an, daß bei Immunisierung gegen körperfremdes Eiweiß die Globuline oder Albumine „vermehrt" seien, sondern es treten Eiweißkörper im Serum auf, die mit diesen Serumfraktionen gleiche Reaktionen zeigen.

Als allgemeines Gesetz bei Immunisierungen kann die Tatsache angesehen werden, daß sich bei Abgabe von Immunkörpern aus den Körperzellen an das Serum zuerst hochkomplexe Eiweißkörper im Serum finden, oder sagen wir lieber: Eiweißkörper, die den hochkolloidalen Eiweißkörpern des Blutes in ihren Reaktionen gleichen; dahin gehört die Thermolabilität der Immunkörper im ersten Stadium der Bildung, ihre relative Unlöslichkeit in destilliertem Wasser und die leichte Ausfällbarkeit durch Neutralsalze und H^+-Ionen. Untersucht man nur das Serum, so kommen nur Körper in Frage, die höchstens mit den Globulinen gleiche Reaktionen zeigen, bei höherem Titer des Immunkörpers finden sich auch Anteile, die den Albuminen gleichen. Bevor aber diese Stufe erreicht wird, scheint sich regelmäßig ein Stadium zu finden, wo diese Körper nur in einer dem Fibrinogen analogen Form vorhanden sind, im Serum also eventuell überhaupt nicht nachgewiesen werden können; es liegt aber unseres Erachtens kein Grund vor, diese Körper nun etwa mit dem Fibrinogen zu identifizieren; auch muß mit der Tatsache gerechnet werden, daß derartige leicht ausfällbare Eiweißkörper, ohne in ihren Fällungsreaktionen mit dem Fibrinogen identisch zu sein, bei der Koagulation zu Fibrin an das entstehende Gerinnsel adsorbiert werden.

Die mehr chemische Erklärung dieser Erscheinungen wäre darin gegeben, daß die hochkomplexen Eiweißkörper mit größerem Molekül (Albumin $<$ Globulin $<$ Fibrinogen) leichter ausfällbar sind, es wäre aber auch eine rein physikalische, kolloid-

chemische Auffassung denkbar, daß nämlich die Immunkörper einen Kolloidkomplex aus Antigen und Zelleiweiß darstellen, die sich in gewissen Mischungsverhältnissen gegenseitig ausfällen (Agglutination, Präcipitation), in jedem anderen Mischungsverhältnis aber — sei es nun, daß die eine oder die andere Komponente im Überschuß vorhanden ist — ihre Löslichkeit erhöhen. Wir wollen diese Theorie der Entstehung von spezifischen Immunkörpern hier nicht eingehend entwickeln, wir beabsichtigen dies später an anderer Stelle zu tun, für die hier interessierenden Fragen wäre diese Auffassung nur insofern von Bedeutung, als danach die verschiedene Fällbarkeit der verschiedenen Anteile eines Immunkörpers nicht auf ihrer eiweißchemischen Zugehörigkeit zu verschiedenen Eiweißfraktionen des Serums resp. Plasmas beruhen würde, sondern daß man darin einen Ausdruck ihrer verschiedenen Löslichkeit zu sehen hätte, bedingt durch ein wechselndes Mischungsverhältnis. Es erscheint auch fraglich, ob diese Verteilung auf die verschiedenen Eiweißfraktionen überhaupt in dem Maße als präexistent angesehen werden kann.

Wie dem auch sei, jedenfalls bilden sich die ersten Anteile eines Immunkörpers im Blut immer in einer Form, die mit Gerinnung des Fibrins ausfällt und im Serum nicht nachweisbar zu sein braucht. Eine rein serologische Untersuchung in dieser Richtung ist dadurch erschwert, weil man Plasma bequem nur in kalkfreiem Zustand verarbeiten kann, und dadurch die Löslichkeitsverhältnisse nicht nur des Fibrinogens, sondern eventuell auch der im Plasma enthaltenen Immunkörper erheblich alteriert werden. Für eine Gesamteiweißbestimmung im Plasma spielt dies natürlich keine Rolle, und es empfiehlt sich aus den angegebenen Gründen, in jedem Fall, wenn man das Gesamteiweiß bei Immunitätsprozessen bestimmen will Plasma und nicht Serum zu verwenden.

Wir konnten mit der oben geschilderten Methode bei einer Reihe von Kaninchen, die wir mit intravenösen Injektionen verschiedener Bakterien behandelten, in jedem Fall ein Ansteigen des Gesamteiweißes im Plasma nachweisen, das dem Ansteigen des Agglutinintiters annähernd parallel lief. Nach den oben gegebenen Ausführungen wird auch die Tatsache verständlich erscheinen, daß wir bei einem Kaninchen, das

gegen Vibrionen immunisiert wurde, im Plasma eine einwandfreie Erhöhung des Eiweißes feststellen konnten, bevor überhaupt im Serum eine nachweisbare Erhöhung des Agglutinintiters festzustellen war. Die Wichtigkeit der mit der Methode zu erzielenden Resultate erhellt wohl ohne weiteres aus dieser Feststellung.

Literatur.

Zur Einleitung: Hailer, Reichs-Gesundheitsamt **29**, 277, 1908. — Hirschberg und Klinger, Deutsche med. Wochenschr. **1914**, 1607. — Zeitschr. f. Immunforsch. **20**, 21, 24.

Zu I. Clementi, Arch. di Farm. **20**, 15. IX. 1915. — Walther, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, Wiesbaden 1903. — Wohlgemuth, diese Zeitschr. **9**, 1 und 10, 1908.

Zu II. Andrews und Goettsch, Journ. Americ. Chem. Soc. **24**, 865. — Berczeller, diese Zeitschr. **84**, 106, 1917. — Dossios und Veith, Zeitschr. f. Chem. **12**, 380, 1869. — Fresenius, Liebigs Annal. **1857**, 184. — Hueppe, Berl. klin. Wochenschr. **1891**, 45. — Ratayama, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **56**, 209, 1907. — Kaufmann und Levite, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **52**, 616, 1919. — Mylius, Zeitschr. f. physiol. Chem. **11**, 306; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **1887**, 688. — Neuberg, diese Zeitschr. **76**, 107, 1916. — Padoa, Atti R. Acad. Lincei **1905**.

Zu III. Butjagin, Hyg. Rundschau **1902**. — Engel, Arch. f. Hygiene **28**, 334. — Hopkins und Pinkus, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**, 1311, 1898. — Joachim, Wiener klin. Wochenschr. **1902**. — Lange, Zeitschr. f. Immunforsch. **24**, 587, 1916; Zeitschr. f. Chemother. **1**, **44**. — Langstein und Mayer, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 1904. — Rohr, Journ. f. prakt. Chem. Neue Folge **31**, 1885. — Macquaire, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **153**, 1084, 1911. — Moll, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 1903. — P. Th. Müller, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**, 454, 1905. — Mulder, Journ. f. prakt. Chem. **44**, 487, 1840. — Neuberg, diese Zeitschr. **6**, 276. — Oswald, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 514; Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**, 230. — Pauly, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 3999, 1908. — Rhode, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 161. — Samtleben, Ber. d. chem. Ges. **31**, 1145, 1898. — Szontagh und Wellmann, Deutsche med. Wochenschr. **1898**.

Über die Wirkung von oberflächenaktiven Stoffen auf Pflanzensamen.

Von

J. Traube und Hedwig Rosenstein.

(Eingegangen am 24. März 1919.)

Diese Mitteilung ist eine Fortsetzung einer an anderer Stelle[1]) erschienenen Arbeit von Traube und Marusawa „Über Quellung und Keimung von Pflanzensamen“.

In jener Arbeit wurden — abgesehen von Quellungsversuchen — Gerste und andere Samen eingelegt in Lösungen von Säuren, Basen, indifferenten Narkoticis, Salzen, Farbstoffen usw.

Von den zahlreichen Einzelergebnissen seien hier nur nochmals die folgenden hervorgehoben:

Säuren wirken in verdünnten Konzentrationen vielfach, wie auch schon von anderen Seiten mitgeteilt wurde, reizend auf die Keimung, d. h. beschleunigend auf die Keimungsgeschwindigkeit, so beispielsweise Schwefelsäure, o-Phosphorsäure, besonders aber Citronensäure; oberhalb bestimmter Schwellenwerte der Konzentration erfolgt dann ziemlich plötzlich die schädigende Wirkung.

Während beispielsweise bei der von Traube und Marusawa ausgeführten Versuchsanordnung beim Einlegen von 50 Gerstenkörnern in eine $^{n}/_{16}$-Salzsäurelösung 30 Körner keimten, keimte in einer $^{n}/_{8}$-Lösung nicht ein einziges. In einer $^{n}/_{4}$-o-Phosphorsäurelösung keimten 32 Körner, in einer $^{n}/_{2}$-Lösung nur ein einziges usf.

Bemerkenswert war die außerordentliche Giftigkeit oberflächenaktiver Fettsäuren. Selbst in $^{n}/_{256}$-Isovaleriansäurelösung

---

[1]) Traube und Marusawa, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. 2, 370, 1915.

keimten bei nur $^1/_2$ stündigem Einlegen ein nur geringer Bruchteil der Gerstenkörner, ein Ergebnis, das in geradem Gegensatz steht zu etlichen vergleichbaren Tierversuchen; zeigt sich doch beispielsweise nach Loebs parthenogenetischen Versuchen am Seeigelei, daß gerade derartige Säuren befähigt sind, eine parthenogenetische Entwicklung anzuregen[1]). Bei den halogenierten Essigsäuren nimmt auffallenderweise die Giftigkeit zu von Trichloressigsäure zu Dichloressigsäure und von dieser zu Monochloressigsäure. Borsäure schädigt weniger die Keimung als das Wachstum.

In bezug auf die Versuche mit Basen sei hier nur auf die große Wachstumsschädigung hingewiesen, welche Gerste durch $^1/_2$ stündiges Einlegen in eine $^n/_{16}$-Lösung von alkylierten Aminen und Ammoniumbasen erfährt im Gegensatz zu gleichkonzentrierten Lösungen von Ammoniak, Kalihydrat, Nicotin usw. Die Keimfähigkeit wird indessen auch durch Ammoniak, Pyridin usw. sehr geschädigt. Über die Wirkung von Alkaloiden, Farbstoffen und Salzen vergleiche die Abhandlung.

Am meisten interessieren uns hier jedoch die damals bereits angestellten Versuche mit oberflächenaktiven Nichtleitern, da diese Versuche in der vorliegenden Mitteilung eine Fortsetzung erfahren. Die Versuche, die mit gewöhnlichen Alkoholen, Äthyläther, Paraldehyd, Propionitril, Aceton, Urethan, Methylacetat und Chloralhydrat angestellt wurden, zeigten, daß bei $^1/_2$ stündigem Einlegen von Gerste in $^n/_8$- und $^n/_4$-Lösungen zunächst der Isoamylalkohol im Gegensatz zum tertiären Amylalkohol ganz besonders giftig war. Als recht giftig erwies sich auch das Chloralhydrat. Beim Einlegen von 50 Gerstenkörnern in $^n/_4$-Chloralhydratlösungen keimten nach 2 Tagen 0, nach 3 Tagen nur 12 Körner, beim Einlegen in $^n/_8$-Lösungen nach 2 Tagen 9, nach 3 Tagen 40 Körner. In den $^n/_4$-Lösungen kam es nach 7 Tagen überhaupt nicht zum Wachstum, die Narkose war irreversibel, in den $^n/_8$-Lösungen war das Wachstum zwar weit erheblicher, aber doch verkümmert. Chloralhydrat erwies sich auch für Pflanzen als ein schädliches Narkoticum. Eine völlige Reversibilität ist nicht vorhanden. Bei den untersuchten milderen Narkoticis ließ sich für verdünntere Konzentrationen ein Erregungsstadium feststellen.

---

[1]) Vgl. indessen weiter unten über Capronsäure und Caprylsäure.

Diese Untersuchungen ließen nun den Wunsch aufkommen, weitere Narkotica bzw. allgemein oberflächenaktive Stoffe in ihrer Wirkung auf Pflanzensamen zu untersuchen.

Es leitete uns dabei u. a. der Gedanke, festzustellen, wie weit die Analogie für Tier und Pflanze vorhanden war, sowie ferner, wie weit die Oberflächenaktivität bzw. der Haftdruck[1]) in Frage kam.

Die Pflanze ist ein vortreffliches Testobjekt, um zu prüfen, ob ein Narkoticum nur vorübergehende oder dauernde Schädigungen herbeizuführen imstande ist, und wenn man auch mit Rückschlüssen auf das Tier vorsichtig sein soll, so erschienen doch gewisse Analogieschlüsse in bezug auf die Art der Wirkung, deren Intensität und Reversibilität bezugsweise Irreversibilität sehr wohl möglich. Besonders aber erschien ein weiteres Studium der „Reizwirkungen" oberflächenaktiver Stoffe auf Pflanzenkeimung und Wachstum von nicht geringem Interesse, denn es kann nicht genug hervorgehoben werden, daß, wenn auch bisher auf diesem Gebiete noch so gut wie nichts praktisch Verwertbares erreicht wurde, wahrscheinlich die Landwirtschaft und Gärtnerkunst gerade nach dieser Richtung hin zu bedeutungsvollen Ergebnissen gelangen wird. Es ist uns beispielsweise kaum zweifelhaft, daß, wenn etwa Wert und Wirkung gewisser tierischer Dünger keineswegs ihrem Stickstoffgehalte parallel gehen, gewisse Reizstoffe eine Rolle spielen, die man bisher nicht beachtet hat. Dasselbe dürfte zutreffen in bezug auf die Wirkung der Böden, Humusarten usw. Was früher Liebig in bezug auf die Zuführung der Nährstoffe für die Pflanze geleistet hat, das wird dereinst ein zukünftiger Liebig leisten müssen, indem er für die Feststellung derjenigen Katalysatoren sorgt, die Pflanzenkeimung und Pflanzenwachstum beschleunigen und nach anderer Richtung begünstigen. Indessen es

---

[1]) Wenn hier von oberflächenaktiven Stoffen die Rede ist, so soll man eingedenk sein, daß Stoffe, wie beispielsweise Chloroform und zahlreiche andere, wegen ihrer leichten Verdampfung aus der Oberfläche eigentlich nicht als oberflächenaktiv bezeichnet werden können (vgl. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 308, 1914). Es sind dies aber alles Stoffe von sehr geringem Haftdruck am Wasser, und wenn daher von oberflächenaktiven Stoffen gesprochen wird, so sollte man besser diese Stoffe allgemein als Stoffe von geringem Haftdruck bezeichnen.

werden sicherlich erst eine ganze Reihe von Vorarbeiten im Laboratorium und auf freiem Felde erfolgen müssen, ehe an endgültige Erfolge zu denken ist.

Die Versuche sind nahezu sämtlich von der einen von uns, Hedwig Rosenstein, ausgeführt worden, und zwar, soweit es sich um flüchtige Narkotica handelt, in folgender Weise:

Je 50 Körner einer guten Saatgerste vom Gute des Herrn Walther Traube in Engelstedt bei Braunschweig wurden 1 Stunde lang in Wasser eingelegt, alsdann in größeren zylindrischen, mit Deckel verschließbaren Gläsern auf 6 faches, mit der gleichen Menge Wasser befeuchtetes Filtrierpapier einzeln ausgebreitet, indem ein kleiner fingerhutgroßer zylindrischer Behälter mit dem betreffenden verdunstenden Stoffe während einer bestimmten Zeit in den größeren Behälter eingesetzt und alsdann dieser gelüftet wurde. Die feuchte Gerste wurde somit lediglich den Dämpfen der betreffenden Stoffe ausgesetzt.

Versuch 1.

Stoff	Wirkungszeit der Dämpfe	Keimzahl nach 1 Tag	Keimzahl nach 2 Tagen
Chloroform	0 Min.	28	48
	1 „	34	49
	2 „	34	48
	5 „	28	49
	10 „	23	45
	20 „	26	45

Versuch 2.

Stoff	Wirkungszeit der Dämpfe	Keimzahl nach 1 Tag	Keimzahl nach 2 Tagen	Keimzahl nach 5 Tagen
Chloroform	0 Min.	18	48	48
	2 „	15	50	50
	30 „	0	39	46

Versuch 3.

0 Min.	16	42
60 „	0	38

Versuch 4.

0 Min.	29	49
24 Std.	0	0

Die Versuche mit Chloroformdampf führen zu dem Ergebnis, daß je nach der Länge der Einwirkung des Dampfes auf die Gerste eine reversible bzw. irreversible Narkose stattfindet, und es scheint, daß auch bei geringer Zeitdauer, bei der Einwirkung von nur 1 bis 2 Minuten ein Erregungsstadium wie bei den Tieren statthat.

Versuch 5.

Stoff	Wirkungszeit der Dämpfe	Keimzahl nach 1 Tag	Keimzahl nach 3 Tagen
Äthyläther	0 Min.	18	48
	5 „	12	50
	10 „	7	48
	20 „	4	48
	30 „	5	45
	45 „	7	47

Versuch 6.

Äthyläther	0 Min.	16	44
	60 „	8	45

Versuch 7.

		1 Tag	2 Tagen
Äthyläther	0 Min.	29	49
	24 Std.	0	0

Versuch 8.

		1 Tag	2 Tagen	4 Tagen
Paraldehyd	0 Min.	19	42	48
	60 „	11	38	48

Ein Vergleich des Äthyläthers mit dem Chloroform zeigt, daß der Ätherdampf eine mildere Narkose hervorruft als der Chloroformdampf, auch hier beobachten wir je nach der Zeitdauer der Wirkung eine reversible bzw. irreversible Narkose. Paraldehyddämpfe wirken gleichfalls weniger stark narkotisch als die Dämpfe des Chloroforms.

Bei den folgenden nicht flüchtigen Narkoticis wurde so verfahren, daß die Samen je 1 Stunde entweder in Wasser oder die betreffenden Lösungen eingelegt und alsdann nicht abgespült auf 6 fachem feuchtem Filtrierpapier in geschlossenen zylindrischen Gefäßen wie oben ausgebreitet wurden.

Versuch 9.

Stoff	Konz. der Lösung %	Keimzahl nach 2 Tagen	Keimzahl nach 3 Tagen	Wachstum nach 6 Tagen, Höhe der Stengel cm
Urethan[1])	0	39	50	1 bis 3
	0	39	46	1 bis 3
	1	39	48	1 bis 4
	1/2	38	48	1 bis 4
	1/4	44	48	1 bis 4
	1/8	48	50	2 bis 3
	1/16	48	50	2 bis 4

Versuch 10.

Stoff	Konz. der Lösung %	Keimzahl nach 2 Tagen	Keimzahl nach 3 Tagen	Wachstum nach 10 Tagen, Höhe der Stengel cm
Sulfonal	0	34	44	4 bis 6
	gesätt. Lös.	31	44	2 bis 5
	1/2 " "	26	42	3 bis 6
	1/4 " "	30	49	3 bis 7
	1/8 " "	35	48	4 bis 6

Versuch 11.

		2 Tagen	7 Tagen	7 Tagen
Veronal	0	31	41	4 bis 5
	gesätt. Lös.	17	26	1 bis 3
	1/2 " "	30	44	3 bis 4
	1/4 " "	25	38	3 bis 4
	1/8 " "	42	42	4 bis 6

Versuch 12.

	%	4 Tagen	6 Tagen
Medinal	0	(15)	(32)
	2	8	35
	1	18	40
	1/2	17	44
	1/4	26	40

---

[1]) Auch eine weitere Versuchsreihe mit Urethan ergab namentlich eine Wachstumsbeschleunigung, so daß weitere Versuche mit diesem Narkoticum nach dieser Richtung sehr erwünscht wären. Sichere Schlüsse kann man erst ziehen, wenn eine größere Anzahl von Versuchsreihen vorliegen.

Versuch 13.

Stoff	Konz. der Lösung	Keimzahl nach 2 Tagen	3 Tagen
	%		
Adalin	0	32	48
	2	32	47
	1	38	44
	1/2	33	46

Während Urethan sich auch bei der Pflanze als ein sehr mildes Narkoticum erweist mit anscheinend vorhandenem Erregungsstadium, und beim Adalin in den untersuchten Konzentrationen überhaupt keine Wirkungen beobachtet werden konnten, bringen stärkere Sulfonal- wie Veronallösungen, wie namentlich die Wachstumsversuche zeigen, dauernde Schädigungen hervor.

Wenn wir die Versuche der älteren Arbeit von Traube und Marusawa über die Wirkung weiterer Narkotica, wie Chloralhydrat, Äthylalkohol usw. mit berücksichtigen, so zeigt sich in bezug auf die Wirkung von Narkoticis auf Tier und Pflanze eine solche Parallelität, daß in bezug auf die Beurteilung der schädigenden oder nicht schädigenden Wirkungen von Narkoticis Versuche mit einem so einfachen Testobjekt wie Gerste von Nutzen sein können.

Die folgenden Versuche beziehen sich gleichfalls auf die Wirkung der Dämpfe auf feuchte Gerste und wurden in derselben Weise wie die Versuche weiter oben mit Chloroform usw. ausgeführt.

Versuch 14.

Stoff	Wirkungszeit der Dämpfe	Keimzahl nach 1 Tag	3 Tagen
Wasser	—	16	44
Thymol	1 Stunde	32	47
Toluol	1 „	12	46
Napthalin . . .	1 „	21	50
Chlorbenzol . .	1 „	7	50
Anilin	1 „	10	49
Pyridin	1 „	22	49
Piperidin . . .	1 „	7	49

Versuch 15.

Stoff	Wirkungszeit der Dämpfe	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen
Wasser	—	29	49
Thymol	24 Stunden	13	42
Toluol	24 „	0	0
Naphthalin . .	24 „	12	41
Chlorbenzol . .	24 „	0	0

Versuch 16.

Wasser	—	11	19
Anilin	24 Stunden	0	31
Pyridin	24 „	0	0
Piperidin . . .	24 „	0	0

Versuch 17.

Stoff	Wirkungszeit der Dämpfe	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tg.	4 Tg.	Wachstum nach 9 Tagen, Höhe d. Stengel cm
Wasser	—	19	42	48	3 bis 8
Aceton	1 Stunde	0	0	—	—
Isobutylacetat .	1 „	0	0	—	—
Isoamylalkohol.	1 „	0	0	—	—
Heptylalkohol .	1 „	25	48	49	4 bis 6
Benzaldehyd . .	1 „	24	42	46	4 bis 6
m-Kresol . . .	1 „	18	48	50	5 bis 7

Versuch 18.

		1 Tag	2 Tg.	3 Tg.
Wasser	—	21	44	48
Isoamylalkohol	5 Min.	10	37	48
	10 „	12	38	46
	20 „	6	33	49
	30 „	0	17	34

Versuch 19.

		2 Tg.	4 Tg.
Wasser	—	44	49
Thymol	15 Min.	46	50
	30 „	49	50
	45 „	47	48

Versuch 20.

Stoff	Wirkungszeit der Dämpfe	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tg.	Wachstum nach 9 Tagen, Höhe d. Stengel cm
Wasser	—	8	39	6 bis 8
m-Kresol	15 Min.	10	31	7 bis 9
	30 „	17	43	6 bis 8
	45 „	20	42	5 bis 7
	90 „	12	42	4 bis 6

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Gerste 1 Stunde lang in die betreffenden Lösungen eingelegt und sonst wie weiter oben verfahren.

Versuch 21.

Stoff	Konz. der Lösung %	Keimzahl nach 2 Tagen	4 Tagen	Wachstum nach 14 Tagen Zahl d. St.	Höhe d. St. cm
Wasser	—	43	49	41	3 bis 6
„	—	45	48	47	5 bis 6,5
m-Kresol	1/2	3	37	35	2 bis 4
	1/4	30	48	48	6
	1/8	41	49	44	6 bis 8
	1/16	43	46	44	6 bis 8
	1/32	42	49	45	6 bis 9
	1/64	44	48	47	5 bis 8

Aus den Versuchen folgt, daß oberflächenaktive Stoffe wie Toluol, Chlorbenzol, ferner Piperidin, Pyridin, Anilin, ebenso Aceton, Isobutylacetat, insbesondere auch Isoamylalkohol, sehr starke Gifte sind. Von den Basen ist am wenigsten giftig Anilin und am giftigsten Piperidin. Die Naphthalin- und Thymoldämpfe wirken bei nicht zu langer Einwirkung erregend, d. h. auf die Keimungsgeschwindigkeit beschleunigend. Die Dämpfe des Heptylalkohols wirken gleichfalls im Gegensatz zum Isoamylalkohol erregend, ebenso die Benzaldehyddämpfe bei 1 stündiger Wirkung.

Es scheint, daß das Desinfiziens m-Kresol in gewissen Konzentrationen das Wachstum der Gerste günstig beeinflußt, indessen derartige Versuche müssen, ehe man sichere Schlüsse ziehen kann, noch häufiger wiederholt werden.

Versuch 22.

Stoff	Konz. der Lösung	Keimzahl nach 2 Tg.	4 Tg.	6 Tg.	Wachstum nach 6 Tagen Zahl d. St.	Höhe d. St. cm
Benzoesäure,	0%	47	50	50	20	1 bis 2
1 Std. eingelegt	gesätt. Lös.	2	9	35	2	1
	1/2 „	38	50	50	12	1
	1/4 „	46	49	49	29	1 bis 2
	1/8 „	45	50	50	33	1 bis 3

Versuch 23.

Benzoesäure,	0%	14	34
24 Std. eingelegt	gesätt. Lös.	0	0
	1/2 „	0	0
	1/4 „	0	0
	1/8 „	0	0

Versuch 24.

Salicylsäure,	0%	48	49
1 Std. eingelegt	gesätt. Lös.	1	6
	1/2 „	16	47
	1/4 „	42	49
	1/8 „	45	48

Versuch 25.

Zimtsäure,	0%	26	48
1 Std. eingelegt	gesätt. Lös.	27	50
	1/2 „	24	49
	1/4 „	(15)	47
	1/8 „	40	49

Die gesättigte Benzoesäurelösung ergab in einem Stalagmometer, in dem die Tropfenzahl für Wasser gleich 53,7 war, die Tropfenzahl 59,9, die gesättigte Salicylsäurelösung = 55,5 und die gesättigte Zimtsäurelösung entsprechend ihrem minimalen Gehalte = 54,9. Mit diesen Oberflächenspannungen stehen die Keimversuche im Einklang.

Bei den folgenden Versuchen wirkte nur der Dampf der betreffenden Fettsäuren, bei Versuch 26 und 28 je 1 Stunde lang, bei Versuch 27 24 Stunden lang auf die betreffende, mit Wasser 1 Stunde lang befeuchtete Gerste (50 Körner).

Versuch 26.

Stoff	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen
Wasser	16	44
Capronsäure . .	20	47

Versuch 27.

	1 Tag	2 Tagen
Wasser	11	19
Capronsäure . .	20	48

Versuch 28.

Wasser	19	42
Buttersäure . .	3	20
Isovaleriansäure	8	38
Caprylsäure . .	28	82

Es ist sehr bemerkenswert, daß höhere Fettsäuren, wie Capron- und Caprylsäure so stark reizende Wirkungen auf die Keimungsgeschwindigkeit der Gerste ausüben. Man denkt hierbei an die hohe parthenogenetische Wirkung auf das Seeigelei nach Loebs Versuchen. Auffallend ist es, daß die niederen Fettsäuren selbst in geringen Konzentrationen, namentlich die Isovaleriansäure (vgl. auch Traube und Marusawa, l. c.), sehr giftig wirken.

Um zu prüfen, ob nicht bei sehr kurzer Wirkung der Dämpfe der Isovaleriansäure doch ähnliche Reizwirkungen wie bei Capron- und Caprylsäure hervorgebracht wurden, brachten wir 50 Gerstenkörner, die 1 Stunde im Wasser lagen, eine verschiedene Anzahl von Minuten in die Dämpfe der Isovaleriansäure.

Versuch 29.

Stoff	Wirkungszeit des Dampfes	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen
Isovaleriansäure	0 Min.	28	48	50
	1 „	25	48	49
	2 „	22	48	49
	5 „	22	49	49
	10 „	28	45	28
	20 „	33	49	50

Versuch 30.

		1 Tag	3 Tagen	5 Tagen
Isovaleriansäure	0 Min.	18	48	48
	20 „	16	49	50
	30 „	12	48	50
	45 „	14	46	48

Eine erheblichere erregende Wirkung wurde somit nicht festgestellt.

Von Desinfizienzien wurde noch β-Naphthol und namentlich Naphthalin untersucht. Die Körner, 50 Stück, wurden 1 Stunde lang und nur bei Versuch 34 24 Stunden lang in die betreffenden Lösungen eingelegt und dann unabgespült auf 6 faches, gleichmäßig befeuchtetes Filtrierpapier im geschlossenen Gefäße ausgebreitet. Die gesättigte β-Naphthollösung ergab im Stalagmometer (Tropfenzahl für Wasser = 53,7) die Tropfenzahl 55,4, die gesättigte Naphthalinlösung in Anbetracht ihres geringen Gehaltes = 53,9.

Versuch 31.

Stoff	Konz. der Lösung	Keimzahl nach 2 Tagen	4 Tagen
β-Naphthol	0 %	43	49
	gesätt. Lös.	17	47
	1/2 „	32	48
	1/4 „	48	48

Versuch 32.

Stoff	Konzentration der Lösung	Keimzahl nach 2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	11 Tg.	Wachstum nach 11 Tagen, Höhe d. Stengel cm
Naphthalin	0 %	25	31	40	49	4 bis 10
	gesätt. Lös.	33	40	49	50	4 bis 9
	1/2 „	38	48	48	50	3 bis 8
	1/4 „	36	46	49	50	4 bis 8
	1/8 „	39	44	46	49	4 bis 9

Versuch 33.

		2 Tg.	3 Tg.	5 Tg.	9 Tg.	Wachstum nach 9 Tagen
Naphthalin	0 %	23	38	43	46	3 bis 6
	gesätt. Lös.	34	38	43	45	4 bis 5
	1/2 „	39	47	49	49	4 bis 5
	1/4 „	32	45	48	48	3 bis 6
	1/8 „	38	45	47	48	4 bis 6

Versuch 34.

		2 Tg.	3 Tg.	4 Tg.	11 Tg.	Wachstum nach 11 Tagen
Naphthalin,	0 %	41	47	48	50	6
die Körner	gesätt. Lös.	24	35	43	45	7 bis 8
24 Stunden	1/2 „	22	39	43	39	6 bis 7
eingelegt	1/4 „	24	36	43	46	8 bis 10
	1/8 „	21	31	41	40	6 bis 9

Versuch 35.

Stoff	Konzentration der Lösung	Keimzahl nach 2 Tg.	4 Tg.	5 Tg.
Naphthalin	0%	31	44	48
	gesätt. Lös.	30	46	48
	1/2 „	39	48	49
	1/4 „	29	45	47
	1/8 „	39	49	49
	1/16 „	39	50	50

Versuch 36.

		2 Tg.	4 Tg.	6 Tg.
Naphthalin	0%	32	47	49
	gesätt. Lös.	42	48	49
	1/2 „	39	48	49
	1/4 „	36	48	48
	1/8 „	38	49	50

Die Versuche mit β-Naphthol und Naphthalin zeigen zunächst, daß die stärkeren β-Naphthollösungen entsprechend der geringeren Oberflächenspannung bei gleicher Dauer der Einwirkung schädlicher auf Gerste einwirken als Naphthalinlösungen. Bei 24 stündiger Einwirkung wirken selbst $^1/_8$ gesättigte Naphthalinlösungen schädlich auf Keimung und Wachstum der Gerste, dahingegen bei 1 stündiger Einwirkung wird die Keimungsgeschwindigkeit der Gerste durch Naphthalin erheblich begünstigt; ob auch das Wachstum gefördert wird, läßt sich noch nicht mit Sicherheit sagen.

Folgende Basen wurden noch geprüft. Die Gerste wurde je 1 Stunde in die Lösungen eingelegt.

Versuch 37.

Stoff	Konz. der Lösung	Keimzahl nach 2 Tagen	4 Tagen
Diphenylamin	0%	43	50
	gesätt. Lös. (unfiltriert)	28	46
	1/2 „	43	47
	1/4 „	46	49

Versuch 38.

		2 Tagen	4 Tagen
Chinolin	0%	43	49
	1 „	0	0
	1/2 „	0	0
	1/4 „	12	46
	1/8 „	38	48
	1/16 „	37	49
	1/32 „	45	49

Die Löslichkeit von Diphenylamin ist sehr gering (Tropfenzahl 54,1, Wasser = 53,7), daher die geringe Wirkung.

Mit oberflächenaktiven Kolloidlösungen wurden die folgenden Versuche ausgeführt. Die Gerste wurde in allen Fällen 1 Stunde lang in die Lösungen eingelegt.

Versuch 39.

Stoff	Konzentration der Lösung	Keimzahl nach 1 Tag	Keimzahl nach 2 Tagen	Wachstum nach 7 Tagen, Zahl der Stengel	Wachstum nach 7 Tagen, Höhe der Stengel cm
Pepton Witte	0 %	10	47	33	1 bis 3,5
	0 „	—	48	39	1 bis 4
	1 „	6	45	33	1 bis 2
	1/2 „	11	49	36	1 bis 3
	1/4 „	16	49	42	2 bis 4
	1/8 „	14	49	43	2 bis 4
	1/16 „	12	43	44	2 bis 4,5

Versuch 40.

Stoff	Konzentration der Lösung	1 Tg.	2 Tg.	4 Tg.	Wachstum nach 9 Tagen, Zahl der Stengel	Wachstum nach 9 Tagen, Höhe der Stengel cm
Med. Seife	0 ‰	8	39	49	44	6 bis 8
	1 „	9	30	48	39	6 bis 10
	1/2 „	14	37	47	37	5 bis 8
	1/4 „	11	45	50	46	5 bis 8
	1/8 „	15	48	49	42	5 bis 9
	1/16 „	5	28	44	38	5 bis 10

Versuch 41.

Stoff	Konzentration	2 Tagen	3 Tagen
Saponin	0 %	37	49
	1 „	44	47
	1/2 „	44	48
	1/4 „	39	47
	1/8 „	45	49
	1/16 „	43	50
	1/32 „	44	50

Versuch 42.

Natrium-cholat	0 %	38
	1 „	37
	1/2 „	30
	1/4 „	30
	1/8 „	37

Die Tropfenzahl einer 1 $^0/_{00}$igen Seifenlösung in einem Stalagmometer (Tropfenzahl für Wasser = 53,7) war 90,2, diejenige einer 1 $^0/_0$igen Saponinlösung = 61,0 und einer 1 $^0/_0$igen Lösung von Natriumcholat = 73,3. Bei allen diesen Stoffen, auch beim Pepton, handelt es sich um stark oberflächenaktive Stoffe. Da indessen derartige kolloide Stoffe nur sehr schwer oder gar nicht in das Gerstenkorn eindringen, ist ihre Wirkung sehr gering. Man hätte allerdings für Seife und Saponin eine stärkere Wirkung vermutet.

Es wurden nun noch eine größere Anzahl Versuchsreihen mit verschiedenen Samen ausgeführt, wie schlecht keimender Gerste, gut und schlecht keimendem Hafer und Roggen, gut und schlecht keimenden Erbsen, Zuckerrüben sowie Zwiebelsamen. Die Samen waren uns gütigst von der Firma Gebr. Dippe in Quedlinburg sowie Herrn Rittergutsbesitzer Steiger in Dresden zur Verfügung gestellt. Die Versuchsstoffe waren Naphthalin und Urethan.

Es leitete uns bei diesen Versuchen zunächst der Gedanke, ob nicht bei anderen Samen die Ergebnisse in bezug auf das Erregungsstadium, die beginnende Giftwirkung usw., andere waren wie bei Gerste. Ferner galt es vor allem, der Frage näher zu treten, ob bei schlecht keimenden Samen nicht durch derartige Reizstoffe eine wesentliche Keimungs- und Wachstumsbeschleunigung statthaben könnte.

Da die Versuche indessen zu keinem ganz eindeutigen Ergebnis führten, so sehen wir von der Veröffentlichung der Zahlen einstweilen ab.

Es zeigte sich jedoch bei diesen vorläufigen Versuchen, daß beispielsweise bei schlecht keimender Gerste, Roggen und Hafer Naphthalin keine Erhöhung der Keimungsgeschwindigkeit hervorbrachte. Auch auf gut keimenden Hafer wirkte Naphthalin im Gegensatz zu gut keimender Gerste anscheinend nicht erregend ein. Dagegen scheint es, daß Urethan in $^1/_8$- und $^1/_{16}$ $^0/_0$iger Lösung bei 1 stündigem Einlegen auf den betreffenden schlecht keimenden Hafer sowohl in bezug auf Keimung wie Wachstum günstig einwirkte, nicht dagegen auf Zuckerrüben. Die Versuche bedürfen indessen einer weitgehenderen Prüfung.

Die Versuche mit Zwiebelsamen wurden namentlich in der

Absicht unternommen, um zu prüfen, ob der Zwiebelgeruch vielleicht eine Reizwirkung auf die Entwicklung anderer Samen hervorrufen würde. Der Erfolg war einstweilen negativ.

Es scheint uns indessen kaum zweifelhaft, daß gerade die Pflanzenduftstoffe, insbesondere Blumengerüche, besondere Bedeutung haben, insofern sie als oberflächenaktive Reizstoffe erregend auf mancherlei Entwicklungsvorgänge der Pflanzen, beispielsweise die Entwicklung der Knospen usw., einwirken.

Schließlich sei bemerkt, daß wir auch mit denselben Reizstoffen, mit denen wir Versuche an Pflanzensamen vornahmen, eine größere Anzahl Versuche ausführten in bezug auf die Entwicklung von Froscheiern sowie in bezug auf die Giftwirkung auf Kaulquappen, um zu prüfen, wie weit von einer Parallelität der Wirkungen auf Tier und Pflanze gesprochen werden kann. Daß diese Parallelität im allgemeinen vorhanden ist, ergibt sich ja bereits aus älteren Versuchen an Kaulquappen und wurde auch im allgemeinen von uns bestätigt. Wir möchten auch hier, da unsere Versuche nicht erschöpfend waren, von der Veröffentlichung der Zahlen einstweilen absehen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung einer größeren Anzahl oberflächenaktiver Stoffe auf die Keimung und das Wachstum von Gerste und anderen Pflanzensamen untersucht.

Für die eigentlichen Narkotica, wie Chloroform, Äthyläther, Urethan usw., die teils als Dämpfe, teils in gelöstem Zustande auf die Gerste wirkten, ergab sich annähernd dieselbe Reihenfolge der narkotischen Wirkungen wie bei der tierischen Narkose; es besteht auch bei den Pflanzen in bezug auf den Keimungs- und Wachstumsvorgang eine reversible und irreversible Narkose, sowie ein Erregungsstadium.

Ebensolche Ergebnisse wurden erzielt bei einer Reihe von Desinfizienzien, wie m-Kresol, Naphthalin usw. Die höheren Fettsäuren, wie Capronsäure, Caprylsäure, wirken in kleinen Mengen stark erregend auf die Keimungsgeschwindigkeit der Gerste ein.

Die Duftstoffe der Pflanzen, wie ätherische Öle usw., gehören zu den oberflächenaktiven Stoffen und dürften daher eine entsprechende Reizwirkung ausüben.

Einige Bemerkungen über die Bedeutung des Blutkalks.

Von

R. Brinkman, Groningen.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(*Eingegangen am 5. April 1919.*)

In einer vor kurzem in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit haben Heubner und Rona[1]) sich über die funktionelle Bedeutung des Blutkalks und über die Wirkung der Schwankungen der totalen Kalkmenge im Blute geäußert. Heubner und Rona haben hervorgehoben, daß sowohl Kalkmangel wie Kalküberschuß abnorme Wirkungen haben, daß also normal eine gewisse Kalkmenge anwesend sein muß. Sie haben weiter die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß die Kalkwirkungen in zwei Gruppen zerfallen: solche, die von der Ionenkonzentration des Calciums im Blutplasma abhängen, und solche, die unabhängig davon sind.

Heubner und Rona scheint aber eine Arbeit entgangen zu sein, die Prof. Hamburger und ich[2]) im vorigen Jahre in dieser Zeitschrift veröffentlicht haben, woraus mit voller Klarheit ein Prinzip hervorgeht, das wir bei unsern späteren Versuchen immer wieder bestätigt gefunden haben und das wir hier noch einmal betonen wollen.

Dieses Prinzip lautet:

Für die Erhaltung der normalen Funktionsfähigkeit der Membranen ist eine ganz bestimmte Calciumionenkonzentration, die nur um einige tausendstel Prozent Variation erleiden darf, unerläßlich. Diese Ionenkonzentration ist in Lösungen, die eine konstante

---

[1]) Heubner und Rona, diese Zeitschr. **93**, 187 bis 226, 1919.

[2]) Hamburger und Brinkman, diese Zeitschr. **88**, 97, 1918.

[H˙] und eine konstante und genügend große [HCO_3'] haben, automatisch eingestellt und fixiert, ganz wie die H-Ionenkonzentration. Auch für die Ca˙˙-Ionen ist also im Blut ein Puffersystem vorhanden.

Bekanntlich kommt das Calcium im Plasma in drei verschiedenen Formen vor, als bivalentes Ca-Ion, als nicht dissoziiertes Ca-Salz [$Ca(HCO_3)_2$] und als kolloidale nicht diffusible Ca-Eiweißverbindung. Prozentisch kommt auf kolloidales Ca-Eiweiß etwa 25%, auf nicht-dissoziiertes Ca-Salz und freie Ca-Ionen etwa 75% des totalen Calciums. Der Gehalt an freien Ca-Ionen wird nach Rona und Takahashi[1]) bedingt durch die Gleichung $\frac{[Ca^{\cdot\cdot}][HCO_3']}{[H^{\cdot}]} = k$; k ist bei 18° im Mittel = 350; für das Blutserum bedeutet das eine [Ca˙˙] von 30 mg pro Liter.

Es ist nun sicher, daß für die funktionelle Wirkung des Blutkalks die Ca-Ionen die erste Rolle spielen. Denkt man ja überhaupt beim Studium der Salzwirkungen in erster Linie an Ionenwirkungen. Bei vielen der sehr zahlreichen Untersuchungen über die Calciumwirkungen ist das Ca ganz oder doch hauptsächlich in Ionenform anwesend gewesen. Weiter hat Sabattani[2]) für mehrere Prozesse nachgewiesen, daß die Wirkung verschiedener Ca-Salze ihrer Ca-Ionenkonzentration proportional ist.

Für die allgemeine Theorie der biologischen Ca-Wirkungen, wie sie z. B. von Höber aufgestellt wurde, sind auch nur Ca-Ionen in Betracht gekommen. Bekanntlich wird in dieser Theorie den Ca-Ionen, als Antagonisten der Na- und K-Ionen, ein verdichtender Einfluß auf biologische Membrankolloiden zugeschrieben; sie sollen eine Art Membranfestigung bewirken, durch die die normale Zellpermeabilität, der Zusammenhalt von Zellverbänden, die Synapse usw. beeinflußt werden.

Eine kräftige Bestätigung findet diese Theorie in zwei Tatsachen, die wir an ganz verschiedenen Objekten festgestellt haben, nämlich in den Einfluß der [Ca˙˙] auf die Permeabilität der Glomerulusmembran des Frosches für Glucose[3]) und auf die

---

[1]) **Rona** und **Takahashi**, diese Zeitschr. **49**, 370.
[2]) **Sabattani**, Arch. Ital. de Biologie **36**, fasc. 3, **39**, 333.
[3]) **Hamburger** und **Brinkman**, diese Zeitschr. **88**, 97, 131.

Hämolyse der Menschenblutkörperchen durch Hypotonie (Versuche, die noch nicht veröffentlicht sind und auf die wir hier nur kurz eingehen wollen). Was unsere Versuche an der Glomerulusmembran betrifft, sei erinnert an folgende Sätze, die sich mit Deutlichkeit ergeben haben.

1. Für die normale Impermeabilität der Glomerulusmembran für physiologische Glucosekonzentrationen ist bei der überlebenden Froschniere die Existenz von $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionen in der Durchströmungsflüssigkeit absolut notwendig.

2. Diese $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionen müssen in ganz bestimmter Konzentration anwesend sein, die nur um einige tausendstel Prozent an Variation erleiden darf. Überschreitung der maximalen und minimalen Ca-Ionenkonzentration bedingt unmittelbar eine völlige Permeabilität der Membran für Glucose.

3. In der Durchströmungsflüssigkeit: NaCl 0,5 %, $NaHCO_3$ 0,285 %, KCl 0,01 % und $CaCl_2$ mindestens 0,02 %, ist die Einstellung der oben geförderten $[Ca^{\cdot\cdot}]$ gesichert; die Konzentration bleibt in solcher Lösung konstant und ist von der totalen Konzentration des Calciums relativ unabhängig.

Aus dieser Arbeit sieht man auch, daß nur die freien Ca-Ionen für die Membrankolloide von Bedeutung sind; die totale Ca-Menge darf innerhalb weit auseinander liegender Grenzen variieren, die Konzentration der freien Ca-Ionen muß konstant bleiben.

Zweitens wollen wir noch einmal betonen, daß diese $[Ca^{\cdot\cdot}]$ einen ganz bestimmten Wert haben soll zur Einhaltung der physiologischen Membranfunktion. Diese Tatsache scheint wohl ein allgemeines Prinzip für die Kalkwirkung zu sein, dem man überall in der Literatur begegnet: Kalkmangel und Kalküberschuß haben beide quantitativ abnorme und vielfach entgegengesetzte Wirkungen; es muß also eine physiologische Mittelkonzentration geben.

Deutlich nun geht dieses Prinzip auch aus unsern Versuchen über die Hämolyse der Menschenblutkörperchen durch Hypotonie hervor[1]). Bekanntlich hemmt das $Ca^{\cdot\cdot}$-Ion diese Hämolyse. Soweit wir wissen, ist diese Er-

---

[1]) Noch nicht veröffentlicht.

scheinung nur für große Ca-Konzentrationen, nicht für physiologische untersucht worden.

Behufs einer Arbeit über die Bestimmung der sogenannten Resistenz roter Blutkörperchen haben wir den Einfluß sehr geringer $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionenkonzentrationen auf die Hämolyse untersucht und sind auch hier zu dem Ergebnis gekommen, daß eine konstante [$Ca^{\cdot\cdot}$] für die Einhaltung der normalen Dispersität der Körperchenkolloide erforderlich ist.

Die Versuche gestalteten sich in folgender Weise:

0,080 ccm Blut aus der Fingerkuppe wurde suspendiert in 5 ccm reiner 0,9 $^0/_0$iger NaCl-Lösung; nach einigen Minuten wurde zentrifugiert, die Flüssigkeit abgehoben und noch einmal NaCl 0,9 $^0/_0$ zur genügenden Auswaschung der Serumbestandteile aufgegossen. Dann wurde wieder zentrifugiert, abgesaugt und die Blutkörperchen in 5 ccm NaCl 0,6 $^0/_0$ aufgeschwemmt. In der hypotonischen Lösung wurden die Körperchen immer eine Viertelstunde sich selbst überlassen. Durch Aufschwemmung derselben Körperchen in einer immer mehr hypotonischen Lösung wurde nun bestimmt, in welcher Lösung die Beginnhämolyse auftrat.

In genau derselben Weise wurde auch die Beginnhämolyse bestimmt in Lösungen, wo dem NaCl immer 0,005 $^0/_0$, resp. 0,010, 0,015, 0,020, 0,030 $^0/_0$ usw. $CaCl_2 \cdot 6$ aq. beigefügt worden war.

Das Resultat war sehr deutlich: in NaCl-Lösungen, die 0,015 bis 0,025 $^0/_0$ $CaCl_2 \cdot 6$ aq. enthalten, liegt die Beginnhämolyse bei merklich schwächeren (stärker hypotonischen) Lösungen als in reinen NaCl-Lösungen oder in NaCl-Lösungen, die mehr als 0,025 $^0/_0$ $CaCl_3 \cdot 6$ aq. enthalten.

Der osmotische Druck der Lösungen, die Beginnhämolyse herbeiführten, wurde ermittelt durch Gefrierpunkterniedrigung. Die folgende Tabelle gibt ein Beispiel:

Versuch 1.

Suspension in	Beginnhämolyse bei	Δ
reiner NaCl	**0,53 $^0/_0$**	$\Delta =$ **— 0,315**
NaCl + 0,005 $^0/_0$ $CaCl_2 \cdot 6$ aq.	0,52 „	$\Delta =$ 0,310
„ + 0,010 „ „	0,52 „	$\Delta =$ 0,312
„ + 0,015 „ „	0,45 „	$\Delta =$ 0,290
„ + 0,020 „ „	0,40 „	$\Delta =$ 0,250
„ + 0,022 „ „	0,44 „	$\Delta =$ 0,275
„ + 0,025 „ „	0,46 „	$\Delta =$ 0,285
„ + 0,030 „ „	0,53 „	$\Delta =$ 0,317
„ + 0,040 „ „	0,53 „	$\Delta =$ 0,320

Man sieht also, daß die meist fragilen Körperchen ihre größte Resistenz haben, wenn in der hypotonischen Lösung 0,015 bis 0,025 % $CaCl_2 \cdot 6$ aq., das ist $\pm$0,0010 bis 0,0015 % freie Kationen vorkommen[1]).

Auch mittels Versuchen, wo die Stärke der Hämolyse in den verschiedenen Lösungen nach Arrhenius[2]) gemessen wird, kommt man zu demselben Ergebnis. Ein Beispiel gibt Versuch 2.

Versuch 2.

Aufschwemmung in				Stärke der Hämolyse
NaCl 0,51 %				15 %
„	+	$CaCl_2 \cdot 6$ aq.	0,005 %	10 „
„	+	„	0,010 „	5 „
„	+	„	0,015 „	0 „
„	+	„	0,020 „	0 „
„	+	„	0,022 „	0 „
„	+	„	0,025 „	5 „
„	+	„	0,030 „	15 „
„	+	„	0,040 „	20 „

Diese Tabelle zeigt wieder, daß die größte Resistenz bei einer [$Ca^{\cdot\cdot}$] von 0,0010 bis 0,0015 % auftritt[3]).

Diese Konzentration ist vermutlich dieselbe, die normal im Säugetierblut vorkommt oder etwas kleiner. Wir müssen also zu dem Schluß kommen, daß die normale [$Ca^{\cdot\cdot}$] des Blutes eine der am meisten günstige für die Resistenz der Körperchen gegen Hypotonie ist.

Wir haben weiter gefunden, daß, wie in der obengenannten

---

1) Die direkte Berechnung sowie die experimentelle Bestimmung der Ca-Ionenkonzentration in NaCl-Lösung 0,5 % hat uns dieses gezeigt.

2) Arrhenius und Madsen, Zeitschr. f. physikal. Chem. 1903.

3) Man kann für einen gegebenen Fall die am meisten resistent machenden [$Ca^{\cdot\cdot}$] wohl noch genauer feststellen, indem man, nach der Behandlung, wie sie in Versuch 2 dargestellt wurde, noch stärker hypotonische Lösung aufgießt und dann wieder bestimmt, welche [$Ca^{\cdot\cdot}$] die optimale Resistenz gibt. Dann aber bekommt man einen Wert, der mit jedem Tag variiert; die äußersten Grenzen sind 0,015 und 0,025 % $CaCl_2 \cdot 6$ aq. Die Ursache dieser Variation muß in dem Alterungsprozeß der Körperchen gesucht werden. Auf die Bedeutung dieser Tatsachen für die Aufstellung einer rationellen Methode für die Resistenzbestimmung werden wir in einer ausführlichen Arbeit zurückkommen.

Durchströmungsflüssigkeit für die Froschniere, in der Lösung: NaCl 0,5 %, $NaHCO_3$ 0,29 %, KCl 0,02 %, $CaCl_2 \cdot 6$ aq. mindestens 0,020 %, diese optimale [$Ca^{\cdot\cdot}$] innerhalb gewisser Grenzen fixiert ist. Sowohl die experimentelle Bestimmung der Hämolyse durch Hypotonie, wie die direkte Bestimmung der [$Ca^{\cdot\cdot}$] in dieser Lösung (mittels einer später zu veröffentlichenden Methode) hat uns dies gezeigt. Auch im Blute muß diese $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionenkonzentration nach der Gleichung $\frac{[Ca^{\cdot\cdot}]\,[HCO_3']}{[H^{\cdot}]} = k$ fixiert sein, und innerhalb gewisser Grenzen unabhängig von der Konzentration des totalen Calciums.

Es ist direkt einleuchtend, wie zutreffend es ist, daß die [$Ca^{\cdot\cdot}$], die für die Einhaltung der normalen Dispersität der Biokolloide ebenso belangreich wie die [$H^{\cdot}$] ist, im Blute auch in analoger Weise konstant gehalten wird.

Es ist deshalb unsere Meinung, daß man sich bei Experimenten über die Rolle des Blutkalks in erster Linie die Frage vorzulegen hat: Wie groß ist die Konzentration der freien Ca-Ionen und in welcher Weise ändert sich diese durch die experimentelle Behandlung? Bei den subcutanen oder intravenösen Injektionen von Ca-Salzen, sowie bei deren oraler oder rektaler Einverleibung oder auch bei Inhalation von Ca-Salzen, wie es in den Experimenten von Heubner und Rona[1]) geschah, müssen wir unbedingt wissen, wie die Konzentration der freien Ca-Ionen hierdurch verändert worden ist; ohne diese Kenntnis ist es unseres Erachtens nicht möglich, die Wirkung des Blutkalks zu beurteilen.

Es ist z. B. unwahrscheinlich, daß eine langsame und nicht zu große Steigerung des Blutkalks überhaupt eine Vergrößerung des freien [$Ca^{\cdot\cdot}$] bewirken wird. Man darf hier also auch keine [$Ca^{\cdot\cdot}$]-Wirkung erwarten. Bei schneller Steigerung des Blutkalks kommt eine Ca-Ionenkonzentrationsvermehrung zustande, die einige Zeit anhält, aber dann wieder auf die Norm zurückgeht; die Ursache dieser Erscheinung ist, daß für die Einstellung des Gleichgewichtes $\frac{[Ca^{\cdot\cdot}]\,[HCO_3']}{[H^{\cdot}]} = k$ einige Zeit nötig

---

[1]) Heubner und Rona, l. c.

ist. Wir haben dieses durch direkte experimentelle Bestimmung der freien [Ca˙˙] festgestellt; die gebrauchte Methode hoffen wir später zu publizieren.

Andererseits aber kann, durch Variation der HCO_3'-Konzentration die freie [Ca˙˙] erheblich schwanken, ohne daß die totale Kalkmenge eine Änderung zeigt. Ein Konstantbleiben des Blutkalks kann daher noch nicht ein Konstantbleiben des funktionell bedeutenden Ca-Ionen einschließen. Erst die Bestimmung des freien [Ca˙˙] des Serums wird uns über die Kalkwirkungen Aufschluß geben können, nicht aber die Messung der totalen Ca-Menge, wie sie von Heubner und Rona ausgeführt wurde.

Beiträge zur Kenntnis der Chitose.

Von

Walther Armbrecht.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Institutes der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 8. April 1919.)

Eines der dunkelsten Kapitel der Kohlenhydratchemie ist die Chemie der Chitose. Trotz zahlreicher Arbeiten auf diesem Gebiet ist es bisher nicht gelungen, den Zucker krystallisiert zu erhalten.

Die Entstehung der Chitose wurde zuerst von M. Berthelot[1]) und G. Staedeler[2]) bei der Einwirkung von Mineralsäuren auf Chitin beobachtet. Nach Ledderhose[3]) entsteht bei der Einwirkung der Säure als primäres Produkt Glucosamin, das erst sekundär in Ammoniak und Chitose zerlegt wird. Beide Reaktionen können nach Sundwick[4]) angeblich auch nebeneinander verlaufen, indem Chitin gleichzeitig in Glucosamin und Chitose zerfällt.

Nach Kruckenberg[5]) wird Chitin auch durch Oxydationsmittel (Kaliumpermanganat, Natriumhypochlorit) zur Chitose abgebaut.

Die konstitutionelle Verknüpfung der Chitose mit Chitin und Glucosamin ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die Chitose kann zwar als unmittelbares Spaltungsprodukt der erwähnten Körper entstanden sein. Nach E. Fischer und H. Leuchs[6]) kann Chitose aus dem Glucosamin erst infolge einer tiefergehenden, bisher nicht endgültig klargestellten Umlagerung hervorgehen.

---

[1]) M. Berthelot, Compt. rend. **47**, 227, 1858.

[2]) G. Staedeler, Annal. d. Chem. **111**, 21, 1859.

[3]) G. Ledderhose, Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**, 213; **4**, 139, 1878.

[4]) E. Sundwick, Zeitschr. f. physiol. Chem. **5**, 384, 1881.

[5]) Fr. W. Kruckenberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 880, 1886.

[6]) E. Fischer und H. Leuchs, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 3790, 1902.

Die Darstellung der Chitose geschah bisher auf folgende Weise: Ledderhose[1]), F. Tiemann[2]), Kueny[3]) und Irvine[4]) brachten Glucosamin mit Kalium-, Natrium-, Barium- oder Silbernitrit in der Wärme in Reaktion. Sie erhielten auf diese Weise einen farblosen, nicht gärungsfähigen, rechtsdrehenden Zuckersirup, der in absolutem Alkohol leicht löslich, durch Äther in amorphen weißen Flocken fällbar war. Freilich blieb es ganz unsicher, ob dieser Zucker ein chemisch einheitliches Produkt darstellt. E. Fischer und Leuchs[5]) führten die Bildung des Zuckers erst auf eine sekundäre Reaktion zurück. Diesen Zuckersirup haben auch E. Fischer und E. Tiemann[6]) durch Einwirkung von Silbernitrit auf Glucosamin erhalten.

Auch sie konnten reine Chitose nicht gewinnen, erhielten aber durch Kochen des Sirups mit Phenylhydrazin eine geringe Menge von Glucosazon[7]). Nach diesem Befunde muß mit dem Reaktionsprodukte eine stereochemische Umlagerung vor sich gegangen sein. Auch Neuberg[8]) gelang es nicht, ausgehend von Chitosehydrazonen zu krystallisierter Chitose zu gelangen.

Angesichts dieser spärlichen Literaturangaben kann es nicht wundernehmen, daß bisher nicht einmal die Formel der Chitose mit Sicherheit festgestellt ist. Denn eine solche konnte bisher nicht durch Analyse der Chitose erhalten werden, da analysenfähige Chitose nicht gewonnen werden konnte; sie mußte vielmehr aus der Zusammensetzung von Derivaten erschlossen werden. Neuberg[9]), der einen nahen Zusammenhang von Chitose mit d-Ribose vermutet, hält die Zusammensetzung $C_6H_{12}O_6$ für richtig; dagegen schreiben E. Fischer und Andreae[10]) der Chitose eine um ein Molekül Wasser ärmere Formel zu, nämlich $C_6H_{10}O_5$ und halten dieselben für ein Derivat eines hydrierten Furans:

$$CH_2OH—\underset{\lfloor____}{CH}—CH(OH)—CH(OH—\underset{____\rfloor}{CH}—CHO \quad (\text{Ringschluss } —O— \text{ zwischen den beiden } CH)$$

[1]) Ledderhose, a. a. O.

[2]) F. Tiemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **17**, 241, 1884.

[3]) Kueny, Zeitschr. f. physiol. Chem. **14**, 330, 1889.

[4]) J. C. Irvine, Journ. chem. Soc. **95**, 564, 1909.

[5]) E. Fischer und H. Leuchs, a. a. O.

[6]) E. Fischer und E. Tiemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, 138, 1894.

[7]) F. Tiemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 50, 1886.

[8]) C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 4009, 1902.

[9]) C. Neuberg, a. a. O.

[10]) E. Fischer und E. Andreae, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **36**, 2589, 1903.

Mit dieser Annahme steht eine Beobachtung aus dem Laboratorium C. Neubergs[1]) im Einklang, derzufolge (im Gegensatz zum Glucosamin) das desaminierte Produkt, die Chitose, durch Salzsäure leicht in Lävulinsäure übergeführt werden kann.

Bei der Unsicherheit, die demgemäß über das Wesen der Chitose in der Literatur herrscht, erscheint es als eine verlockende Aufgabe, die Versuche zum Studium dieser Substanz wieder aufzunehmen.

Es möge mir gestattet sein, über einige Versuche, die ich in den Jahren 1913 und 1914 auf Veranlassung von Prof. v. Fürth in dieser Richtung ausgeführt habe und deren Fortsetzung durch den Kriegsausbruch und meine Einrückung zur militärischen Dienstleistung bisher verhindert worden ist, als Beitrag zum Studium dieser merkwürdigen Substanz im folgenden zu berichten.

I. Darstellung des Ausgangsmaterials.

Als Ausgangsmaterial dienten mir Crustaceenpanzer (von Nephrops norvegicus herrührend), die ich, dank dem liebenswürdigen Entgegenkommen des Herrn Prof. Dr. Carl Cori, Direktor der k. k. zoologischen Anstalt in Triest, in genügender Menge erhalten konnte.

Die Verarbeitung der Panzer geschah in ähnlicher Weise wie bei Offer[2]) und Lenk[3]). Die Krebspanzer wurden mit roher Salzsäure behandelt, bis keine Entwicklung von Kohlensäure mehr bemerkbar und die Entkalkung der Schalen vor sich gegangen war. Die Anwendung von roher (gegenüber reiner verdünnter) Salzsäure erscheint insofern zweckmäßig, als auf diese Weise der Zusammenhang der Stücke gelockert wird. Dann wurden die Stücke in fließendem Wasser mehrere Stunden gewaschen. Nun wurde zur Entfernung der Proteine mit Lauge ausgekocht und wieder gründlich gewaschen. Auf diese Weise konnte ohne Anwendung von Bleichmitteln vollständig farbloses Chitin erhalten werden, während nach dem bisherigen Vorgange erst Entfärbungsmittel (Permanganat, Bisulfit u. dgl.) angewendet werden mußten.

Das so erhaltene Chitin wurde dann nach den Angaben

---

[1]) H. Hamburger, diese Zeitschr. **36**, 3, 1911.

[2]) Offer, diese Zeitschr. **7**, 117, 1907.

[3]) E. Lenk, diese Zeitschr. **23**. 50, 1909.

von v. Fürth und Russo[1]) in Chitosan übergeführt: Das grob zerkleinerte Chitin wurde mit der fünffachen Menge Ätzkalis und etwas Wasser in einer Silberschale im Ölbade auf 180° erhitzt und eine halbe Stunde unter öfterem Umrühren auf dieser Temperatur (Thermometer im Ölbade) erhalten. Die erkaltete Schmelze wurde dann mehrmals mit Wasser zur Entfernung des überschüssigen Ätzkalis gründlich gewaschen. Die Entfernung des Ätzkalis mit Wasser geht bedeutend schneller und erscheint zweckmäßiger als die Behandlung mit Alkohol am Rückflußkühler, wie sie früher üblich war. Das erhaltene freie Chitosan zeigt noch vollständig die Struktur des Ausgangsmaterials. Dieses wurde nun in verdünnter Essigsäure gelöst, evtl. ein ungelöster Rückstand durch Glaswolle abgetrennt und das Filtrat durch Alkalizusatz als gallertartige Masse ausgefällt. Diese wurde auf einen gehärteten Filter gesammelt und bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion mit Wasser gewaschen.

Für die weiteren Untersuchungen war unter den krystallisierten Chitosanverbindungen das Chitosanchlorhydrat wegen seiner Löslichkeit in heißem Wasser am zweckdienlichsten. Zu diesem Zwecke wurde dieses nach den Angaben von v. Fürth und Russo hergestellt. Die gallertartige Chitosanmasse wurde in verdünnter Salzsäure in Lösung gebracht und dann so lange konzentrierte Salzsäure zugesetzt, bis keine Fällung mehr eintrat. Es wurde nun bis zur vollständigen Lösung erwärmt und dann ganz langsam abkühlen gelassen, wobei sich das Chitosanchlorhydrat in wohlausgebildeten mikroskopischen Krystallen abschied.

Die krystallisierte Masse wurde dann filtriert, mehrmals aus heißem Wasser umkrystallisiert, erst mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, dann mit Alkohol, schließlich mit Äther gewaschen und endlich über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Auf diese Weise erhielt ich dieselben sehr charakteristischen Krystalle, wie sie v. Fürth und Russo seinerzeit erhalten hatten, und gelang es mir, ohne Anwendung von Entfärbungsmitteln immer rein weißes Chitosanchlorhydrat darzustellen.

---

[1]) O. v. Fürth und M. Russo, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **1906**, 163.

II. Einwirkung von salpetriger Säure auf Chitosan.

Bei diesen Versuchen wurde krystallisiertes Chitosanchlorhydrat, welches in der oben angegebenen Weise dargestellt worden war, in Wasser in der Wärme gelöst, aus der Lösung das freie Chitosan mit Natronlauge gefällt, filtriert und mit Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gewaschen. Die gallertartige Masse wurde im Wasser suspendiert und auf diese Suspension salpetrige Säure einwirken gelassen. Aus praktischen Gründen, um nämlich nicht unnötigerweise anorganische Bestandteile beizumengen, wurde salpetrige Säure nicht in Form von festem Nitrit oder von Nitritlösung unter Zusatz von Säure angewendet, sondern im gasförmigen Zustande eingeleitet. Zu diesem Zweck wurde in einem kleinen Gasentwicklungsapparat aus arseniger Säure und konzentrierter Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,3 durch schwaches Erwärmen salpetrige Säure dargestellt. Während des Einleitens ging die gallertartige Masse unter Stickstoffentwicklung vollständig in Lösung. Das Einleiten wurde so lange fortgesetzt, bis keine Gasentwicklung mehr wahrnehmbar war. Ein etwaiger Überschuß an salpetriger Säure wurde durch einen kräftigen Luftstrom oder Erwärmen auf dem Wasserbade vollständig vertrieben, bis keine Reaktion mit α-Naphtylamin und Sulfanilsäure mehr eintrat.

Schon der Umstand, daß alles in Lösung gegangen war, läßt darauf schließen, daß kein unverändertes Chitosan mehr vorhanden ist. Die erhaltene wäßrige Lösung zeigt folgende Reaktionen:

1. Durch Natronlauge tritt keine Fällung mehr ein (es ist also kein unverändertes Chitosan mehr in der Lösung).
2. Mit Natronlauge erwärmt, färbt sich die Lösung gelb, schließlich braun (Verharzung).
3. Durch Alkohol tritt keine Fällung ein, wohl aber ist das Reaktionsprodukt aus der alkoholischen Lösung durch Äther fällbar. Da es aber sehr hygroskopisch ist, läßt es sich auf diese Weise nicht isolieren.
4. Die wäßrige Lösung reduziert stark Fehlingsche Kupferlösung.
5. Ammoniakalische Silberlösung wird unter Bildung eines Silberspiegels reduziert.
6. Jodlösung tropfenweise zugesetzt, wird entfärbt.

7. Beim Schütteln mit Benzoylchlorid in alkalischer Lösung erhält man ein Additionsprodukt.

8. Resorcin bei Gegenwart von konzentrierter Salzsäure ruft rotbraune Färbung hervor (Schaum purpurrot); beim Kochen tritt eine satte rote Färbung ein.

9. Gärungsversuche ergaben, daß der Zucker nicht gärungsfähig ist.

10. Da die Lösung immer Salpetersäure enthält, ist es nicht ohne weiteres möglich, durch qualitative Prüfung auf Stickstoff die Vollständigkeit der Reaktion in bezug auf Elimination von Stickstoff zu konstatieren. Es sei auf die in diesem Laboratorium ausgeführten Untersuchungen von H. Brach[1]) verwiesen, aus denen hervorgeht, daß der ganze Stickstoff des Chitins und Chitosans durch Einwirkung von salpetriger Säure abgespalten wird.

Diese Reaktionen weisen darauf hin, daß die wäßrigen Lösungen eine oder mehrere Zuckerarten enthielten. Es wurde nun versucht, den Zucker näher zu ckarakterisieren.

Da die Lösung beim Eindunsten einen nicht krystallisierenden Sirup hinterließ, wurde die Gewinnung eines krystallisablen Derivates versucht.

III. Darstellung eines krystallisierten Osazons.

Zu diesem Zwecke wurde Phenylhydrazin [und zwar nach E. Fischer[2]) ein Gemenge von salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat] in neutraler Lösung einwirken gelassen. Als die Lösung auf dem Wasserbad anhaltend erwärmt wurde, schied sich beim Erkalten ein rotgelbes Produkt ab. Nach Abtrennung desselben wurde bei neuerlichem Erwärmen und darauffolgendem Erkalten immer wieder eine derartige Abscheidung erhalten. Diese ließ sich aus 60% Alkohol unter Zuhilfenahme von Tierkohle umkrystallisieren. Durch sehr oftmaliges Umkrystallisieren und Auswaschen mit Äther, wodurch eine rotgelbe Verunreinigung entfernt wurde, konnte das Reaktionsprodukt in schönen gelben Nadeln krystallisierend erhalten werden. Der Schmelzpunkt wurde durch schnelles Erhitzen in einem Schmelzpunktapparat nach Thiele schließlich bei 202° (unter Gasentwicklung) konstant gefunden. Dieses Präparat, das bei 110° getrocknet worden war, wurde zur Analyse verwendet.

---

1) H. Brach, diese Zeitschr. **38**, 468, 1912.

2) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 77, 1908.

Die Analyse des Osazons ergab folgende Werte:

0,1545 g	0,0880 g H_2O	6,37 %	H
	0,3405 g CO_2	60,11 %	C
0,1622 g	0,0900 g H_2O	6,21 %	H
	0,3582 g CO_2	60,23 %	C
0,1676 g	0,0933 g H_2O	6,23 %	H
	0,3723 g CO_2	60,58 %	C

Die Analysen von C und H ergaben im Mittel für:

C 60,30 %
H 6,27 %.

Die Bestimmung des Stickstoffs ergab, nach Dumas ausgeführt, folgende Werte:

0,1465 g Substanz	bei 751 b 20°	20,5 ccm	16,11 %	N
0,0491 g „	„ 750 b 22°	7,0 „	16,17 %	N
Die Bestimmung ergab im Mittelwert . .			16,17 %	N.

Berechnet für $C_{18}H_{22}O_4N_4$:

Gef.		Ber.
Gef. C	60,30 %	C = 60,33 %
„ H	6,27 %	H = 6,15 %
„ N	16,17 %	N = 15,64 %
		O = 67,88 %
		100,00 %.

Auf Grund der Analyse scheint ein Hexosazon vorzuliegen. Zur genaueren Identifizierung des Osazons wurde die optische Aktivität desselben geprüft. Eine Lösung von der Helligkeit, wie sie notwendig ist, um 0,2 g in 4 ccm Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol bei Auerlicht nach den Angaben von Neuberg[1]) polarisieren zu können, war trotz wiederholtem Umkrystallisierens in unserem Fall nicht erhältlich. Wohl aber gelang es, bei elektrischem Bogenlicht die Drehung zu bestimmen. Es wurden 0,2 g in der Wärme gelöst. Es ergab sich so in mehreren Bestimmungen übereinstimmend

0,2 g in 4 ccm Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol
— 1° 12′.

Das Pyridin war vor dem Gebrauch nach den Angaben von Neuberg[1]) über Kali rektifiziert worden.

Zum Vergleich wurde das Osazon der Glucose dargestellt und in derselben Konzentration und bei derselben Beleuchtung auf sein Drehungsvermögen untersucht. Dabei wurde für 0,2 g in 4 ccm Pyridin und

[1]) C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 3389, 1899.

6 ccm absolutem Alkohol eine Drehung der Polarisationsebene von — 1,50° erhalten[1]).

Schon dieser Unterschied im Drehungsvermögen der beiden Osazone spricht dafür, daß sie miteinander nicht identisch sind. Außer dem abweichenden Wert für die Drehung spricht noch folgender Umstand dafür, daß das erhaltene Osazon nicht Glucosazon ist. Während sich nämlich von Glucosazon 0,2 g oder evtl. noch mehr schon in der Kälte in 4 ccm Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol leicht lösen, ist die Löslichkeit des von mir erhaltenen Osazons in der Kälte in diesem Lösungsmittel sehr gering, und es ist Erwärmung notwendig, um die Substanz überhaupt in Lösung zu bringen. Ferner läßt sich Glucosazon auch in absolutem Alkohol [0,2 g in 10 ccm[2])] polarisieren, während das von mir hergestellte Osazon in diesem Lösungsmittel selbst in der Hitze unlöslich ist. Auch läßt sich Glucosazon, und zwar 0,1 g in 12 ccm Eisessig[3]) gelöst, polarisieren, in welchem Lösungsmittel das von mir hergestellte Osazon ebenfalls unlöslich ist.

Angesichts dieser Befunde mußte es als wünschenswert erscheinen, die Angaben Tiemanns[4]) über das aus Glucosaminchlorhydrat erhältliche Osazon zu überprüfen.

Darstellung eines Osazons, ausgehend vom Glucosaminchlorhydrat.

Glucosaminchlorhydrat wurde aus Chitosan-Chlorhydrat durch Erhitzen mit konz. Salzsäure unter Beigabe von Zinnchlorür zur Vermeidung der Huminbildung bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft. Das Produkt wurde aus heißem Wasser mehrmals umkrystallisiert. Die Ausbeute an ganz reinem Präparat betrug aus 50 g Chitosanchlorhydrat 12 g Glucosaminchlorhydrat. Nachdem zur Sicherheit noch quantitative Stickstoffbestimmungen (gef. 6,63%, 6,94%, ber. 6,5%) gemacht worden waren, wurde auf die wäßrige Lösung des Glucosaminchlorhydrats salpetrige Säure wie bei den früheren Versuchen einwirken gelassen. Die erhaltene Lösung gab dieselben Reaktionen wie die Lösung, die ausgehend von Chitosanchlorhydrat erhalten worden war.

Die Lösung, die nach dem Einleiten von salpetriger

[1]) C. Neuberg (a. a. O.) hat unter ähnlichen Bedingungen — 1,30° beobachtet.

[2]) H. Ost, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **28**, 1503, 1895.

[3]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, 2478, 1894.

[4]) F. Tiemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 118ff., 1886.

Säure erhalten und von deren Überschuß befreit worden war, wurde genau neutralisiert und mit Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat behandelt. Durch Erwärmen auf dem Wasserbade wurde ebenfalls ein rotgelbes Produkt erhalten, das nach oftmaligem Umkrystallisieren aus 60 % Alkohol, Pyridinalkohol und Waschen mit Äther in schönen, zu Büscheln vereinigten gelben Nadeln erhalten wurde. F.P. bei 202°.

Die Polarisation des erhaltenen Osazons wurde ebenfalls bei elektrischem Bogenlicht ausgeführt; dabei ergaben sich folgende Werte:

0,2 g in 4 ccm Pyridin und 6 ccm abs. Alkohol $\begin{cases} -1,19^0 \\ -1,20^0. \end{cases}$

Nach der Drehung der Polarisationsebene zu schließen, ist also das Hexosazon aus Chitosan vollständig identisch mit dem ausgehend von Glucosamin erhaltenen Osazon. Für diese Vermutung spricht auch die Löslichkeit der beiden Osazone, die vollständig gleich und von der des Osazons der Glucose verschieden ist. Denn die beiden Osazone sind in Pyridin-Alkohol nur schwer, in der Kälte überhaupt nicht, sondern erst beim Erwärmen löslich, wobei es aber nicht möglich ist, hellgefärbte Lösungen zu erhalten. In absolutem Alkohol sind beide Osazone gar nicht löslich, während Glucosazon in beiden Lösungsmitteln sich leicht löst. Abweichend von F. Tiemann[1]) konnte ich also die Bildung von Glucosazon nicht feststellen; es dürfte vielmehr das bisher nicht bekannte Osazon der Chitose vorliegen.

Wenn man die beiden Osazone, das aus Chitosan und das aus Glucosamin erhaltene Osazon mischt, schmilzt die Mischung wieder bei 202°. Mischt man hingegen die erhaltenen Osazone mit Glucosazon, so zeigt sich eine Depression des Schmelzpunktes. Auch dieser Umstand spricht dafür, daß die aus Chitosan und Glucosamin erhaltenen Osazone miteinander identisch sind und beide vom Glucosazon verschieden.

Die Resultate meiner Befunde über die aus Chitosan und Glucosamin erhältlichen Osazone lassen sich dahin zusammenfassen, daß beide Wege zu ein und demselben vom Glucosazon

---

[1]) F. Tiemann, a. a. O.

durch Löslichkeit, Drehung und Schmelzpunkt[1]) deutlich verschiedenen Osazon führen, welches wahrscheinlich das noch unbekannte Chitoseosazon darstellen dürfte.

Versuche mit Nitrophenylhydrazin, Methylphenylhydrazin, Bromphenylhydrazin und Thiosemicarbacid aus der Zuckerlösung krystallisierte Produkte zu erhalten, blieben resultatlos.

IV. Über die Zuckerausbeuten bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf Chitosan.

Was die Ausbeuten bei meiner Arbeit betreffen, habe ich aus 60 g Chitosanchlorhydrat 15 g Zucker (nach Bertrand ermittelt) erhalten. Diese 15 g Zucker lieferten $2^1/_2$ g reinen Osazons. Angesichts der schlechten Ausbeuten erschien es aussichtslos, auf dem Wege über das Oson weiter zu krystallisierenden Verbindungen zu gelangen. Andererseits hielt ich es für geboten, über den nicht krystallisierenden Rest Aufschluß zu erlangen. Dies geschah in der Weise, daß quantitative Zuckerbestimmungen nach Bertrand und quantitative Bestimmungen der Trockensubstanz ausgeführt wurden.

Zu diesen Bestimmungen wurden jedesmal 5 g Ausgangsmaterial, und zwar einmal 5 g Chitosansulfat, die anderen Male 5 g Chitosanchlorhydrat angewendet. Aus diesen Mengen wurde das freie Chitosan gefällt, alkalifrei gewaschen und in der oben geschilderten Weise mit salpetriger Säure behandelt. Die erhaltene Lösung wurde auf 100 ccm aufgefüllt und in aliquoten Mengen einerseits der Zuckergehalt, andererseits die Trockensubstanz ermittelt.

	Trockensubstanz	Zucker gef.	Zucker ber.
5 g Chitosansulfat lieferten	1,49 g	1,45 g	3,00 g
5 g Chitosanchlorhydrat lieferten . . .	1,61 g	1,88 g	3,70 g
5 g " " . . .	1,48 g	1,26 g	

Es zeigt sich also, daß die Bestimmungen des Zuckers nach Bertrand annähernd dieselben Werte lieferten wie die Bestimmungen der Trockensubstanz, und daß nach beiden Arten von Bestimmungen sich eine konstante Differenz gegenüber

---

[1]) Der Schmelzpunkt des Glucosephenylosazons wird von C. Neuberg (Handbuch d. Biochem., herausg. von Oppenheimer 1, 169) mit 210° angegeben.

den auf Grund der theoretischen Berechnung nach der Chitosanformel von Brach[1]) zu erwartenden Werten ergibt.

Auch bei Berücksichtigung der Abspaltung der im Chitosanmolekül enthaltenen Essigsäure müßte sonach eine erheblich größere Zuckermenge resultieren als sich auf Grund der leidlich miteinander übereinstimmenden Zucker- und Trockensubstanzbestimmungen tatsächlich ergibt. Es läßt dies wohl kaum eine andere Deutung zu, als daß bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf Chitosan flüchtige Produkte in nicht unbeträchtlicher Menge entstehen.

Damit ist aber auch schon gesagt, daß es sich dabei nicht etwa um einen einfachen Austausch von Aminogruppen gegen Hydroxyle handeln könne, daß vielmehr kompliziertere Spaltungsvorgänge unbekannter Art dabei eine Rolle spielen. Man wird gut tun, sich dabei zu vergegenwärtigen, daß ein Teil der salpetrigen Säure in der Reaktionsflüssigkeit stets in Salpetersäure übergeht, die wohl ihrerseits einzugreifen vermag.

Schon dem Gesagten zufolge wird man schwerlich erwarten können, in dem Chitosesirup einen einzigen und chemisch einheitlichen Zucker vorzufinden. Ich habe es versucht, mir über diesen Punkt dadurch Klarheit zu verschaffen, daß ich feststellte, ob die Relation zwischen Reduktionsvermögen und optischem Drehungsvermögen bei Chitosesirupen verschiedener Provenienz eine konstante sei oder nicht. Und ich fand tatsächlich in einer Reihe von Versuchen, daß von einer Konstanz dieser Art keine Rede sei, vielmehr differieren die sich in verschiedenen Versuchen ergebenden Verhältniswerte innerhalb weiter Grenzen.

Wir haben daher allen Grund, die chemische Einheitlichkeit des sich bei Einwirkung von salpetriger Säure auf Chitosan bzw. auf Glucosamin ergebenden reduzierenden Reaktionsproduktes, des sog. „Chitosesirup“, zu bezweifeln. Damit finden wohl auch die schlechten Ausbeuten an Osazon eine Erklärung, und wir werden wohl gut tun, die Bezeichnung „Chitose“ für jenen Bestandteil dieses Gemenges zu reservieren, der befähigt ist, sich mit Phenylhydrazin zu einem wohlcharakterisierten Produkte zu vereinigen.

---

[1]) Brach, a. a. O.

V. Oxydation des Chitosesirups.

Um über die Natur des durch Einleiten von salpetriger Säure in eine Suspension von freiem Chitosan erhaltenen Zuckergemenges nähere Aufklärung zu erhalten, wurden Oxydationsversuche angestellt.

Oxydationsversuche mit der hypothetischen Chitose wurden schon von verschiedenen Forschern unternommen. E. Fischer und Tiemann[1]) oxydierten Chitoselösung mit Brom. Sie stellten ein Calciumsalz der erhaltenen Säure dar, das sie mit der entsprechenden Menge Oxalsäure zerlegten. Durch Einengen der erhaltenen Lösung glaubten sie auf diese Weise zunächst ein Gemisch von freier Chitonsäure (einer anscheinend der Chitose entsprechenden Aldonsäure) und ihres Lactones erhalten zu haben; letzteres ließ sich aber durch Natriumamalgam nicht zu Chitose reduzieren und ergab bei der Oxydation mit Salpetersäure Oxalsäure und Isozuckersäure. Romyn[2]) führte die Oxydation mit Jod in boraxhaltiger Lösung aus und glaubt ebenfalls Chitonsäure erhalten zu haben. E. Fischer und Andreae[3]) setzten die Untersuchungen des Calciumsalzes fort und fanden, daß dieses nach 10stündigem Stehen bei 140° über Phosphorsäureanhydrid bei 10 mm Druck noch Wasser verliert, wonach die Chitonsäure nicht die Formel $C_6H_{12}O_7$, sondern $C_6H_{10}C_6$ hätte. Da an der Anhydridbildung die Carboxylgruppe nicht beteiligt ist, wäre die Chitonsäure als ein Derivat eines Hydrofurans aufzufassen. Diese Vermutung konnten die beiden Forscher auch beweisen, indem sie das Kaliumsalz mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat kochten und so aus dem Reaktionsgemisch das Acetat der Oxymethylbrenzschleimsäure

```
             CH—CH
             ‖   ‖
   HO.H₂C.CH     C.COOH
             \   /
               O
```

erhielten.

Bei der Oxydation der Chitose mit Salpetersäure erhielt Tiemann[4]) Isozuckersäure. Zu diesen Versuchen verwendet Tiemann Glucosaminchlorhydrat, das er aus Chitin dargestellt hatte, konnte aber bei der Oxydation kein einheitliches Calciumsalz erhalten, sondern ein Gemisch von isozuckersaurem und norisozuckersaurem Calciumsalz, welch letzteres um ein Molekül Wasser mehr enthält als ersteres. Anscheinend leiten sich die Salze mit Krystallwasser von der Norisozuckersäure, die Salze ohne Krystallwasser von der Isozuckersäure ab. E. Fischer und An-

---

[1]) E. Fischer und Tiemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 27, 138, 1894.

[2]) Romyn, Zeitschr. f. anal. Chem. 36, 350.

[3]) E. Fischer und Andreae, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 2587, 1903.

[4]) F. Tiemann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 27, 118, 1894.

dreae[1]) teilen die Ansicht Tiemanns, derzufolge die Isozuckersäure ein Hydrofuranderivat sei, glauben jedoch nicht, daß eine Norisozuckersäure als wohldefinierte Verbindung existiere. Nach Tiemann bilden die Salze der Isozuckersäure krystallisierte Produkte, während die Salze der Norisozuckersäure zerfließliche Produkte liefern, die bei 100° in die um 1 Molekül Wasser ärmeren isozuckersauren Salze übergehen. Eine vollständige Klarheit in bezug auf diese Ergebnisse ist bisher noch nicht erlangt worden, was ja dem Obengesagten zufolge um so verständlicher erscheint, als die chemische Einheitlichkeit der Chitose nicht gewährleistet ist.

Freies Chitosan wurde in der eingangs geschilderten Weise mit salpetriger Säure behandelt. Die Zuckerbestimmung nach Bertrand ergab 20 g Zucker. Nach Zusatz von 62 ccm Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,2 wurde auf dem Wasserbade eingedampft, bis rotbraune Dämpfe entwichen. Jetzt wurden noch 30 ccm Salpetersäure zugesetzt; es wurde bis zum Sirup eingedampft, hierauf in Wasser aufgenommen und die saure Lösung mit Kalk auf dem Wasserbade neutralisiert. Der Überschuß von Kalk wurde durch Kohlensäure unter fortwährendem Erwärmen auf dem Wasserbade entfernt, abgesaugt und das Filtrat eingedampft. Nun wurde im Wasser aufgenommen und mit Alkohol versetzt. Dabei fiel ein anfangs weiches, bei einigem Stehen körnig werdendes Calciumsalz aus. Das Fällen mit Alkohol wurde deshalb ausgeführt, weil das Calciumsalz sehr zu übersättigten Lösungen neigt und der anhaftende Firnis nur sehr schwer erstarrt. Außerdem findet gleichzeitig beim Wiederholen der Alkoholfällung eine Abtrennung etwa beigemengter Spuren von Calciumnitrat statt, das in Alkohol löslich ist, während das erhaltene Calciumsalz in Alkohol unlöslich ist. Auf diese Weise wurden 7 g eines Calciumsalzes erhalten. Da das Calciumsalz schwer krystallisierbar war, wurde daran gegangen, ein krystallisiertes Derivat desselben zu erhalten. Das Calciumsalz wurde in Wasser gelöst und $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure zugesetzt, bis die Lösung eben anfing, Kongopapier zu bläuen. Nachdem auf diese Weise die Säure in Freiheit gesetzt und andererseits das Calcium in Gips übergeführt worden war, wurde unter Erwärmen Cinchonin[2]) bis zur Sättigung zugesetzt.

[1]) E. Fischer und F. Andreae, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **36**, 2587, 1903.

[2]) Kürzlich sind Brucinsalze der Chitonsäure und der Chitarsäure von P. A. Levene und G. M. Meyer (Journ. of Biolog. Chem. **26**, 355,

Nach dem Erkalten wurde filtriert und der Überschuß von Chinchonin durch langandauernde Extraktion im Soxhletapparate mit Äther entfernt. Die so erhaltene Lösung wurde dann auf dem Wasserbade eingedampft und vom abgeschiedenen Gips filtriert. Es wurde dann weiter eingeengt, bis an der Oberfläche Krystallisation zu bemerken war. Beim Erkalten krystallisierte ein schneeweißes Produkt in langen Prismen aus. Dieses wurde aus heißem Wasser umkrystallisiert und auf diese Weise rein erhalten. Schmelzpunkt 200°. Es wurde noch einige Male aus heißem Wasser umkrystallisiert; dabei blieb der Schmelzpunkt konstant bei 200°. Dasselbe Präparat, nochmals aus heißem Wasser und etwas Alkohol umkrystallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, hatte wieder den gleichen Schmelzpunkt.

In diesem Zustande wurde das Präparat zur Analyse verwendet.

Analyse des Cinchoninsalzes.

0,1612 g Substanz	0,3791 g CO_2	64,14 % C.
	0,0925 g H_2O	6,42 % H.
0,1620 g „	0,3802 g CO_2	64,02 % C.
	0,0978 g H_2O	6,75 % H.

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

0,1155 g Substanz	4,8 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4	5,80 % N.
0,1088 g „	4,7 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4	6,05 % N.
0,1268 g „	5,5 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4	6,07 % N.

Die Analyse des Cinchoninsalzes ergab:

Gef. im Mittel	Ber. für $C_6H_{10}O_6 \cdot C_{19}H_{22}N_2O$
C 64,07 %	C 63,56 %
H 6,59 %	H 6,78 %
N 5,97 %	N 5,93 %
	O 23,73 %
	100,00 %

Das Ergebnis der Analyse hat eigentlich etwas Überraschendes. Denn nach den Erfahrungen der Literatur mußte bei der Oxydation einer Hexoselösung mit Salpetersäure eine Dicarbonsäure erwartet werden. Die Analyse stimmt aber sonderbarerweise auf das Cinchoninsalz einer Monocarbonsäure. Wenn

1915; Chem. Centralbl. **1**, 743, 1917) in bezug auf ihre Drehung untersucht worden.

man nun aber bedenkt, daß zur Analyse ein gut krystallisiertes Präparat benutzt worden war, dessen Krystalle unter dem Mikroskop alle den gleichen Habitus aufwiesen, daß ferner das Präparat seinen Schmelzpunkt beim Umkrystallisieren nicht mehr änderte und daß endlich die Analysen untereinander und mit der Formel $C_6H_{10}O_6.C_{19}H_{22}N_2O$ leidlich übereinstimmen, so besteht wohl kein Grund, der Analyse Mißtrauen entgegenzubringen. Es muß vielmehr als Tatsache hingenommen werden, daß die Oxydation in diesem speziellen, von mir geschilderten Falle zu einer Monocarbonsäure geführt hat. Was nun die Struktur des erhaltenen Produktes betrifft, so kann man sowohl der erhaltenen Bruttoformel als auch den Ergebnissen der bisherigen Forschungen in gleicher Weise gerecht werden, wenn man das Cinchoninsalz als ein Hydrofuranderivat[1]) auffaßt und ihm etwa folgende Konstitution zuschreibt (wobei über die sterische Konfiguration nichts ausgesagt werden soll):

```
CH2 . OH
 ·
CH ——————┐
 ·       │
CHOH     │
 ·       O
CHOH     │
 ·       │
CH ——————┘
 ·
COOH.C19H22N2O.
```

Ich verweise darauf, daß nach C. Neuberg[2]) der Chitarsäure, nach E. Fischer und E. Andreae[3]) sowohl der Chitonsäure als der Chitarsäure die Formel $C_6H_{10}O_6$ und die Struktur

```
        OH.CH—CH.OH
           |    |
HO.H2C.CH    CH.COOH
          \  /
           O
```

zukommen dürfte.

---

[1]) Ich möchte es nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, daß auch Y. Kotake und Y. Sera (Osaka), Zeitschr. f. phys. Chem. 88, 56, 1913, ihrem aus Pilzen dargestellten Lykoperdin, das dem Chitosan nahe verwandt zu sein scheint, die Konstitution eines Hydrofuranderivates zuschreiben.

[2]) C. Neuberg, H. Wolf und W. Neimann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 4009, 1902.

[3]) E. Fischer und E. Andreae, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 2587, 1903.

Ich bemerke endlich, daß in meinem Reaktionsprodukte keine Oxalsäure enthalten war, also eine maximale Oxydation sicherlich nicht stattgefunden hatte. Auch steht das Auftreten einer Monocinchoninverbindung mit der Auffassung des Produktes als einer Monocarbonsäure im Einklange. — Es wäre ja nicht einzusehen, warum eine Dicarbonsäure nicht 2 Moleküle Cinchonin an sich zu ketten befähigt sein sollte.

Zusammenfassung.

Die Resultate meiner Arbeit lassen sich in folgender Weise zusammenfassen:

1. Bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf Chitosan geht dieses vollständig in Lösung. Die resultierende Zuckerlösung enthält aber keine einheitliche Zuckerart, sondern wahrscheinlich ein Gemenge reduzierender Aldosen, und zwar Hexosen. Aus der erhaltenen Lösung konnte ein Osazon erhalten werden, das mit Glucosazon nicht identisch war, wohl aber mit einem Osazon, das ausgehend von Glucosamin erhalten werden konnte. Wahrscheinlich handelt es sich hier um ein Chitoseosazon, das von dem Glucosazon durch seine Schwerlöslichkeit in Pyridinalkohol, seine Unlöslichkeit in absol. Alkohol und Eisessig und sein Drehungsvermögen unterschieden ist.

2. Die Oxydation des Chitosesirups mit Salpetersäure führte zu einem in Form einer Cinchoninverbindung gut krystallisierenden einheitlichen Derivat einer Monocarbonsäure, in der ein Hydrofuranring vermutet werden kann.

3. Demgemäß stehen unsere Befunde sowohl mit der Ansicht C. Neubergs, derzufolge die hypothetische Chitose eine wahre Hexose von der Formel $C_6H_{12}O_6$ ist, als auch mit der Meinung desselben Autors sowie E. Fischers und seiner Mitarbeiter, derzufolge die Chitarsäure und die Chitonsäure als Hydrofuranderivate aufzufassen wären, im Einklange.

Angesichts der in dieser Arbeit ausgesprochenen Vermutung, daß der Chitosesirup kein einheitliches Produkt sei, würde sich bei der weiteren Bearbeitung des Gebietes vor allem die Notwendigkeit ergeben, dieses anscheinend komplizierte Gemenge in seine einzelnen Bestandteile zu zerlegen.

Über Bakterien-Katalase.

III. Mitteilung[1]).

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 12. April 1919.)

Die Erforschung der Konstitution der Fermente gehört sicherlich zu den schwierigsten Aufgaben der Biochemie. Wenn auch die Feststellung, welche chemische Gruppierung im Molekül der Fermente entscheidend für ihre spezifische Wirkung ist, am wichtigsten wäre, so würde doch ein bedeutsamer Schritt getan sein, wenn das Gesamtmolekül eines Fermentes in seinem Bau erkannt wäre. Lediglich die Reindarstellung eines Fermentes würde schon einen Wendepunkt in der Lehre von den Fermenten bedeuten. Alle diese Wünsche sind aber sehr schwer erfüllbar, einmal wegen der großen Labilität der Fermente, außerdem aber wegen der Schwierigkeit, diese kolloiden Stoffe von ihren ähnlich sich verhaltenden Beimengungen zu isolieren.

Als ich gesehen hatte, daß man auf Nährböden von chemisch genau bekannter Zusammensetzung gut wirksame Bakterienfermente gewinnen konnte, war es klar, daß hier ein geeignetes Material für Isolierungsversuche gegeben ist. Bis zu einem gewissen Grade konnte man erwarten, weniger als unter den sonst gegebenen Bedingungen durch zufällige Beimengungen irregeführt zu werden. Ohne Zweifel werden aber auch bei diesem schönen Ausgangsmaterial erhebliche Schwierigkeiten noch zu überwinden sein. Seit meiner letzten Publikation habe ich die Untersuchung andauernd weitergeführt und bin bisher so weit gelangt, daß ich überzeugt bin, auf dem richtigen Wege zu sein.

Vor einigen Monaten haben Willstätter und Stoll[2]) in

---

[1]) I. Mitteilung diese Zeitschr. **89**, 350. — II. Mitteilung diese Zeitschr. **92**, 129.

[2]) Liebigs Annalen **146**, H. 1, 21.

einer wichtigen Arbeit Versuche beschrieben, welche die Aufklärung der Konstitution einer Peroxydase zum Ziele haben. Bei der Schwierigkeit des Stoffes ist es nicht zu verwundern, daß das Ziel trotz feinster Methodik noch nicht erreicht werden konnte. Obwohl das Ausgangsmaterial der Autoren keineswegs durch diejenigen Vorzüge ausgezeichnet ist, die mein Bakterienmaterial besitzt, wurden doch Resultate von größtem Interesse erzielt. Aus Meerrettich wurde eine sehr aktive Peroxydase, von der bereits 0,04 mg eine starke Wirkung entfaltete, in Form eines Glucosides isoliert, das anscheinend ein verhältnismäßig kleines Molekulargewicht (500) besitzt. Im Molekül scheint neben einer Pentose eine Hexose und 3 Atome N sich zu finden. Außer anderen anorganischen Stoffen fand sich in dem Präparat Eisen, ohne daß schon entschieden werden konnte, ob das Eisen zum Glucosidmolekül gehört. Von dem Glucosid mit Peroxydasewirkung ließ sich durch Sublimatfällung ein Glucosid ohne Peroxydasewirkung trennen. Anscheinend handelt es sich hier um eine Substanz von höherem Molekulargewicht. Auf wiederum 3 Atome N kommen neben einer Hexose hier 2 Pentosen.

In früheren Mitteilungen habe ich schon geschildert, wie ich mein Rohmaterial für die Katalasedarsellung aus Proteusbakterien gewinne. Das Wesentlichste ist, daß ich von möglichst einfachen Nährböden von bekannter chemischer Zusammensetzung ausgehe. Das so gewonnene Ferment ließ sich aussalzen, ferner durch Quecksilbersublimat ausfällen. Aus dem Sublimatniederschlage konnte es durch Cyankalium wieder extrahiert werden. In der letzten Mitteilung hatte ich dann gezeigt, daß sich die so gewonnene Katalase ganz wie die in der Literatur beschriebenen Katalasen in bezug auf die Gesetze der Wirksamkeit verhält.

Um das Ferment weiter zu isolieren, ergab sich als Hauptaufgabe die Berücksichtigung der Schwierigkeit, daß das Ferment große Neigung hat, in eine unlösliche Modifikation überzugehen. Es mußte also ein Fällungsmittel aufgefunden werden, das eine erhebliche Abtrennung von Beimengungen gestattet, ohne daß das Ferment dabei unlöslich wird. Nach einigen Versuchen fand ich als vortreffliches Fällungsmittel für das Ferment den Methylalkohol. Mit Methylalkohol kann man aus den Kulturen bei geeigneter Konzentration das Ferment sehr gut niederschlagen, während erhebliche Anteile der Kulturen,

die aber ohne Katalasewirkung sind, im Methylalkohol gelöst bleiben. Das Ferment ist im Niederschlag in wasserlöslicher Form enthalten und kann durch Filtrieren von in Wasser unlöslichen Beimengungen getrennt werden. Diese Prozedur kann ohne Schaden mehrfach wiederholt werden, und man erhält so hochwirksame in Wasser lösliche Katalasepräparate.

Selbstverständlich müssen die Präparate wiederum als Basis für weitere Isolierungsversuche dienen. Es ergibt sich die Aufgabe, die Zusammensetzung der Präparate zu ermitteln. Doch ist es schon wertvoll, nunmehr bereits eine gleichmäßige Reinigungsstufe zu haben und so Präparate von möglichst konstanter Zusammensetzung zu erhalten, die man immer wieder in beliebiger Quantität darstellen kann.

Im folgenden schildere ich Beispiele von Darstellungen der Katalase. Geht man so vor, so erhält man fast immer hochwirksame Präparate. Die angegebenen Verhältnisse der Fällungs- und Lösungsmittel sind die Mengen, die sich allmählich als die zweckmäßigsten ergeben haben.

Als Nährlösung für die Proteusbakterien wurde eine Mischung benutzt, in der auf 100 ccm Wasser kamen: Chlornatrium 0,6 g, Magnesiumsulfat 0,04 g, Dikaliumphosphat 0,25 g, Chlorcalcium 0,005 g. Ferner kamen auf je 100 ccm 0,4 g asparaginsaures Natrium und 0,3 g milchsaures Natron.

Gegenüber den früheren Versuchen haben wir nur insofern eine Änderung vorgenommen, als wir die Menge des Calciumchlorids auf die Hälfte herabgesetzt haben.

Präparat I.

380 ccm dieser Nährlösung wurden in Einzelportionen von je 8 ccm verteilt und nach dem Sterilisieren mit Proteusbakterien geimpft, die 4 Tage auf demselben Nährboden sich entwickelt hatten. Nach 6tägiger Bebrütung wurden die Kulturen, die sich gut entwickelt hatten, in einem Becherglase vereinigt und mit 760 ccm Methylalkohol ausgefällt. Es entstand sofort ein massiger, flockiger Niederschlag, der sich schnell absetzte. Sogleich wurde mit der Filtration begonnen, die in etwa 2 Stunden beendigt war. Nunmehr wurde der Niederschlag leicht abgepreßt und in 400 ccm Wasser aufgenommen. Die Mischung blieb über Nacht im Eisschrank. Bis zum nächsten Tage hatte sich der Niederschlag zum Teil gelöst. Darauf wurde filtriert und 398 ccm eines opaken Filtrates erhalten. Das Filtrat wurde im Faust-Heimschen Apparate bei Zimmertemperatur

durch Überleiten eines Luftstromes eingedunstet, in 18 Stunden war die Flüssigkeit verdampft. Der Bodensatz wurde dann mit dem Spatel abgekratzt, es resultierte ein weißes Pulver, dessen Gewicht 0,3183 g betrug. Das Pulver wurde an der Luft bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, sein Gewicht nahm dabei bis auf 0,3168 g ab.

Zur Prüfung der Wirksamkeit werden 10 mg in 20 ccm Wasser aufgenommen. Das Pulver löst sich nur schlecht. Nach 15 Minuten wird filtriert.

Von dem klaren Filtrat werden je 4 ccm = 2 mg, 2 ccm = 1 mg, 1 ccm = 0,5 mg, 0,5 ccm = 0,25 mg auf 10 ccm mit Wasser aufgefüllt. Zu jeder Portion kommen je 2 ccm H_2O_2 (1,5 %) = 0,03 g H_2O_2.

Nach ½ stündigem Aufenthalt im Brutschrank werden die Gemische titriert.

Es werden gespalten durch

2,0 mg	99,5 %
1,0 „	98,3 %
0,5 „	87,8 %
0,25 „	59,0 %.

Präparat II.

In einem anderen Versuche werden 296 ccm einer ebenso bereiteten Nährlösung in Einzelportionen von je 8 ccm verteilt und nach dem Sterilisieren mit Proteusbakterien geimpft, die 2 Tage auf demselben Nährboden sich entwickelt hatten. Nach 15 tägigem Wachstum werden die üppig entwickelten Kulturen in einem Becherglase vereinigt und mit 592 ccm Methylalkohol ausgefällt. Der Niederschlag wird schnell abfiltriert und in 300 ccm Wasser aufgenommen. Die Mischung bleibt über Nacht auf Eis. Nunmehr wird filtriert. Man erhält ein milchiges Filtrat, das innerhalb 19 Stunden durch Überleiten eines Luftstromes im Faust-Heimschen Apparat getrocknet wird. Das erhaltene Pulver wiegt 0,1841 g. Nachdem es lufttrocken ist, wiegt es 0,1838 g.

Von diesem Pulver werden 10 mg abgewogen und in 200 ccm Wasser aufgenommen. Es löst sich schlecht. Nach 15 Minuten wird filtriert.

Von dem klaren Filtrat werden einzelne Portionen wie im vorigen Versuche geprüft.

Es werden gespalten durch

2,0 mg	98,3 %
1,0 „	98,3 %
0,5 „	98,3 %
0,25 „	88,3 %.

Nach 3 Monaten:

2,0 mg	99,5 %
1,0 „	91,1 %
0,5 „	83,9 %
0,25 „	52,5 %.

Präparat III.

400 ccm Nährlösung werden wie in den eben geschilderten Versuchen mit Proteusbakterien geimpft, die 2 Tage auf demselben Nährboden sich entwickelt hatten. Nach 5tägigem Wachstum werden die gut entwickelten Kulturen mit 800 ccm Methylalkohol gefällt. Der schnell abfiltrierte Niederschlag wird in 400 ccm Wasser aufgenommen und so über Nacht auf Eis aufbewahrt. Am nächsten Tage wird filtriert, das sehr opake Filtrat wird im Faust-Heimschen Apparat getrocknet, die Trocknung nimmt 24 Stunden in Anspruch. Das erhaltene Pulver wiegt 0,2753 g. Nachdem es lufttrocken ist, wiegt es 0,2723 g.

Die Prüfung auf Wirksamkeit wird wie in den anderen Versuchen vorgenommen.

Es werden gespalten durch

2,0 mg	99,5 %
1,0 „	98,0 %
0,5 „	79,7 %
0,25 „	44,7 %.

Nach 2 Monaten:

2,0 mg	99,5 %
1,0 „	67,1 %
0,5 „	35,1 %
0,25 „	18,6 %.

Um die Einzelheiten dieser Schilderung richtig zu würdigen, sind noch einige Erläuterungen notwendig.

1. Die Impfung der Nährflüssigkeit erfolgt mit einigen Ösen einer Kultur, die bereits auf derselben Nährflüssigkeit gewachsen war. Dadurch wird vermieden, daß mit den Bakterien fremde Substanzen, wie sie z. B. in der gewöhnlichen Nährbouillon vorhanden sind, in die Kulturen gelangen.

2. Wir setzen die Versuche nicht in Massenkulturen an, sondern beschicken Einzelröhrchen mit nur je 1 ccm, weil infolge der so erzielten bedeutenden Vergrößerung der Oberfläche die Bakterienernte viel reichlicher ausfällt.

3. Um den Nährboden möglichst vollständig auszunutzen, darf die Brutzeit nicht zu kurz gewählt werden.

4. Zur Verbesserung der Ausbeute darf man bei der Übertragung der Kulturen aus dem Röhrchen in das Sammelglas, in dem die Ausfällung vorgenommen wird, sich nicht damit begnügen, die Kulturen auszugießen, sondern man muß die Bakterien auch von den Wänden des Glases, an denen immer ein Teil haftet, sorgfältig abkratzen.

5. Die Konzentration — 2 Teile Methylalkohol auf 1 Teil Kultur — wurde als die optimale erkannt. Wenn man weniger Methylalkohol zufügt, bleibt ein Teil des Fermentes in Lösung. Die Tatsache, daß das Ferment in nicht zu konzentrierten Lösungen von Methylalkohol löslich ist, ist interessant, und man kann durch Weiterverarbeitung der Lösung eine wertvolle Fermentreinigung erzielen. Aber um eine möglichst befriedigende Ausbeute an Ferment zu erzielen, eignet sich die Lösung in Methylalkohol nicht. Denn hier ist der Fermentverlust zu groß.

Der große Vorzug des Methylalkohols als Fällungsmittel gegenüber dem Äthylalkohol besteht darin, daß hier das Ferment nicht seine Löslichkeit in Wasser verliert. Da anzunehmen ist, daß auch beim Methylalkohol eine möglichst kurze Berührung des Fermentes mit dem Alkohol für das Bestehenbleiben der Wasserlöslichkeit nützlich ist, haben wir die Fällung und Filtration möglichst beschleunigt. Während aber beim Äthylalkohol selbst sehr beschleunigtes Arbeiten kaum etwas nützt, spielt die Zeit der Einwirkung beim Methylalkohol keine erhebliche Rolle.

6. Hat man den durch Methylalkoholfällung erhaltenen Niederschlag im Wasser verteilt, so ist es zweckmäßig, die Filtration erst nach einigem Abwarten vorzunehmen. Anscheinend geht das Ferment erst allmählich in Lösung. Eine irgendwie erhebliche Schädigung des Fermentes tritt durch das vorübergehende Verweilen in gelöster Form nicht ein, da die Veränderung bei Eisschranktemperatur nur sehr allmählich erfolgt.

7. Die Eindunstung im Faust-Heimschen Apparat muß unbedingt in 24 bis 30 Stunden beendet sein, was auch ohne Schwierigkeiten möglich ist. Längeres Verweilen schwächt das

Ferment ab. Immer wurde Zimmertemperatur benutzt. Da erhöhte Temperatur nicht nötig ist, wurde nicht geprüft, ob sie ohne Schaden angewandt werden kann.

Stickstoffgehalt der Präparate.

Präparat I.

0,0745 g enthalten 5,46 mg N = 7,3 % N.
0,1120 g " 8,26 " N = 7,4 % N.
0,0828 g geben 0,0230 g Glührückstand = 27,8 %.
Stickstoff, berechnet auf aschefreie Substanz = **10,1 %** N.

Präparat II.

0,0798 g enthalten 5,6 mg N = 7,0 % N.
0,0772 g geben 0,0253 g Glührückstand = 32,7 %.
Stickstoff, berechnet auf aschefreie Substanz = **10,1 %** N.

Präparat III.

0,1000 g enthalten 6,9 mg N = 6,9 % N.
0,1036 g " 7,0 " N = 6,8 % N.

Als Glührückstand wird der Mittelwert der beiden vorigen Präparate angenommen = 30,7 %.

Stickstoff, berechnet auf aschefreie Substanz = **9,9 %** N.

Die Übereinstimmung der erhaltenen Werte ist sehr befriedigend. Wenn man bedenkt, daß es sich um vollkommen getrennte Darstellung handelt, so ist es bemerkenswert, daß bei Präparat I und II genau der gleiche Stickstoffgehalt der aschefreien Präparate erhalten wurde. Bei Präparat III fehlt leider die Bestimmung des Glührückstandes. Wir haben daher aus den Werten bei I und II das Mittel genommen. Auch dieser Stickstoffwert stimmt befriedigend mit den beiden anderen überein.

Zunächst soll diese quantitative Untersuchung nur zu einer vorläufigen Orientierung dienen. Nach dem Ausfall der Analysen eröffnen sich aber neue Aussichten und Ausblicke. Es ist deutlich zu erkennen, daß unsere einfache Methodik doch zu erheblich einheitlicheren Präparaten führt, als man hoffen durfte. Es ist daher erwünscht, die Isolierung fortzuführen, daneben aber auch die schon begonnene qualitative Untersuchung, soweit die Hilfsmittel und die Zeitumstände es gestatten, eifrig weiter zu betreiben.

Studien zur quantitativen Bestimmung sehr geringer Ca-, Mg- und P-Mengen in tierischen Substanzen.

Von

L. Dienes.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 17. März 1919.)

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen wurden vor dem Kriege angefangen und waren in den wesentlichen Ergebnissen fertig. Sie wurden während einer ruhigeren Periode des Krieges in einem unter meiner Leitung stehenden Feldlaboratorium beendet. Der letzterwähnte Umstand soll entschuldigen, daß die Beziehungen auf die Literatur mangelhaft und vielleicht einige Teile der Untersuchung unvollständig geblieben sind. Ich habe nur volumetrische Verfahren ausprobiert und hatte keine Gelegenheit, diese mit gravimetrischen Mikromethoden zu vergleichen. — Soweit ich aus der Literatur beurteilen kann, könnte man genauere Werte, bei sehr kleinen Mengen, durch ein gravimetrisches Verfahren auch nicht erreichen. Wir werden uns erst mit der Bestimmung des Ca, Mg und P in reinen Lösungen und nachher mit der Trennung derselben von den anorganischen Bestandteilen der tierischen Substanzen beschäftigen.

Bekanntlich ist das volumetrische Verfahren auch zur Bestimmung kleiner Substanzmengen geeignet. Wenn genügend auf die Reinheit der Büretten geachtet wird, sowie darauf, daß die Ausflußgeschwindigkeit klein und gleich sei, wie bei der Kalibrierung der Bürette, so kann man aus einer in eine dünne Capillare endenden Bürette Flüssigkeitsmengen mit 1 bis 2 Tausendstel Kubikzentimeter Genauigkeit ausfließen lassen[1]). Nach meiner

[1]) Emich, Lehrbuch der Mikrochemie 1911, S. 8.

Erfahrung soll man die Titrierung in möglichst kleinen Volumen vornehmen und nicht sehr verdünnte Titrierflüssigkeit benützen, damit das Endvolumen der Lösung möglichst klein und der Übergang möglichst scharf bleibe. Die Titrierung habe ich in später zu beschreibenden Röhrchen mit $\frac{n}{100}$-$KMnO_4$-Lösung, bei der P-Bestimmung mit $\frac{n}{30}$-HCl gemacht. Zur Illustration, wie weit die Genauigkeit der Titration selbst geht, teile ich einige Daten mit, die ich bei Einstellung der $KMnO_4$-Lösung mit Oxalsäure gewonnen habe.

Tabelle I.

Abgewogen	0,404	g	$^n/_{50}$-	Oxalsäure	erfordert	0,899	ccm	$KMnO_4$	(ber.	auf	0,4	g	Oxals.	0,881	ccm)
„	$0,399_7$	„	$^n/_{50}$-	„	„	0,878	„	„	(„	„	0,4	„	„	0,879	„)
„	$0,412_5$	„	$^n/_{25}$-	„	„	1,447	„	„	(„	„	0,4	„	„	1,403	„)
„	$0,401_5$	„	$^n/_{25}$-	„	„	1,404	„	„	(„	„	0,4	„	„	1,399	„)
„	$0,402_5$	„	$^n/_{25}$-	„	„	1,407	„	„	(„	„	0,4	„	„	1,398	„)
„	0,996	„	$^n/_{25}$-	„	„	3,408	„	„	(„	„	1,0	„	„	3,422	„)
„	$0,503_4$	„	$^n/_{25}$-	„	„	1,722	„	„	(„	„	1,6	„	„	3,425	„)

Zum Überführen von kleinen Flüssigkeitsmengen benütze ich Capillarröhrchen, zum Teil solche, die oberhalb der Capillaren zu einer 1 bis $1^1/_2$ ccm fassenden Kugel aufgeblasen sind. Zum Aufnehmen und Ablassen der Flüssigkeit in den Capillaren bediene ich mich eines kleinen Gummiballons, der mit einem 10 bis 12 cm langen Gummischlauch versehen ist. Die Capillare wird mit dem Daumen und Zeigefinger gehalten, der Ballon kommt zwischen die Handfläche und die drei anderen Finger. Nach entsprechender Übung kann man auf diese Weise mit der größten Sicherheit die gewünschte Flüssigkeitsmenge aufnehmen, nur darf die Capillare nicht zu eng sein. Um den Inhalt eines kleinen Tiegels zu überführen, wasche ich ihn 5 bis 6 mal mit 2 bis 4 Tröpfchen Flüssigkeit aus einer Capillare (0,2 bis 0,3 ccm Flüssigkeit) aus, jedesmal achtgebend, daß die Flüssigkeit die ganze Oberfläche des Tiegels benetzt.

Zur Bestimmung und Trennung von Mg benütze ich die Abscheidung des Ca als Oxalat und das Titrieren des Niederschlages mit $KMnO_4$-Lösung. Es hängt von 3 Umständen ab, bis zu wie kleinen Ca-Mengen man heruntergehen kann, ohne

die Genauigkeit wesentlich zu beeinflussen: 1. Ob die Abscheidung des Ca vollständig ist und wie groß die Mengen sind, die in Lösung bleiben. 2. Wieviel von Mg mitgerissen wird und ob die zweifache Fällung des Ca unterbleiben kann. 3. Ob man den Niederschlag unbedingt abwaschen muß, oder ob unter geeigneten Umständen, trotz der bisher geltenden Erfahrung[1]), dieses Auswaschen unterbleiben kann.

Ich habe über die Löslichkeit des Calciumoxalats in Ammoniumoxalat, Ammoniumchlorid und Ammoniak enthaltenden Lösungen keine Angaben gefunden. Ich habe selbst folgende Werte erhalten, die aber keinen Anspruch auf Genauigkeit erheben und nur über die Größenordnung der Verluste bei der Analyse orientieren. Diese Werte sind auch deshalb ungenau, weil die Analysen in den später zu beschreibenden größeren Röhrchen durchgeführt sind, die für so kleine Mengen ungeeignet sind und immer höhere Werte geben. Obwohl ich Korrektionen angebracht habe, bleiben diese sicher gegenüber der erforderlichen Korrektion zurück. 13 ccm Flüssigkeit, die über dem Calciumoxalatniederschlag 2 % Ammoniumchlorid und $\frac{2,4\,n}{100}$ Ammoniumoxalatkonzentration enthalten hat und von H_3N schwach alkalisch war, hat bei der Analyse 0,009 mg Ca ergeben, in 1 ccm = $0{,}0007_2$ mg, die Flüssigkeit wurde nach 5stündigem Stehen filtriert. In 19,5 ccm Flüssigkeit mit 1,1 % Ammoniumchlorid und $^n/_{200}$-Ammoniumoxalat habe ich 0,024 mg Ca, d. h. in 1 ccm = $0{,}001_2$ mg gefunden. Die Flüssigkeit wurde nach 5stündigem Stehen auf einer kleinen Handzentrifuge zentrifugiert und hat sich schwer geklärt. 12 ccm Flüssigkeit, die ich von 6 Ca-Bestimmungen abpipettiert habe, 1 % Ammoniumchlorid und ungefähr $^n/_{200}$-Ammoniumoxalat (nach 5stündigem Stehen abzentrifugiert) enthalten hat, ergab 0,014 mg Ca, auf 1 ccm = 0,0012 mg. Kleinere Werte bekommen wir für die Löslichkeit des Calciumoxalats, wenn wir die Resultate der Analysen, die in kleinerem und größerem Volumen ausgeführt sind, vergleichen. Nach den Analysen 1 bis 3 und 8 bis 10 der Tabelle II haben die ersten 3 Analysen um $0{,}002_2$ mg weniger als die erwarteten Werte ergeben in 2,32 ccm Flüssigkeitsvolumen; derselbe Unterschied ist 0,0052 mg bei 7,31 ccm

[1]) Th. Döring nach Chem. C. 2, 913.

Volumen, d. h. 0,0006 auf 1 ccm Flüssigkeit. Dieser Wert ist ungefähr die Hälfte des vorher erhaltenen und liegt sehr nahe jenem Wert, den wir nach Filtrieren der Flüssigkeit bekommen haben. Wie die Analysen 11 bis 12 zeigen, beeinflußt die Erhöhung der Ammoniumchloridkonzentration auf 3 % die Löslichkeit des Calciumoxalats nicht merklich. Nach diesen Zahlen kann man auf eine Genauigkeit der Bestimmungen, die bis auf Bruchteile von $^1/_{1000}$ mg geht, nur dann rechnen (bei der Konzentration des Ammoniumoxalats, welches wir benutzt haben), wenn das Volumen der Flüssigkeit bei der Fällung des Calciumoxalats unter 1 ccm bleibt.

Nach Richards und seinen Mitarbeitern[1]) ist die Trennung des Ca von Mg durch einfache Fällung als Oxalat vollkommen, bei ungefähr äquimolekularen Lösungen, wenn die Flüssigkeit bei 1 % Ammoniumchlorid in 1 ccm nicht mehr als 0,45 mg Ca enthält und die überstehende Flüssigkeit von dem Niederschlag nach 3 bis 4 Stunden getrennt wird, bei 2facher Konzentration des Ca und Mg geht der Fehler auch nicht über 0,3 %. Unsere Analysen haben zu denselben Ergebnissen geführt. In der Tabelle II finden wir im Mittel bei Vorhandensein von Mg die Ca-Werte nicht ganz um 0,3 % erhöht (0,35 % des vor-

Tabelle II.

Abgemess. Ca mg	Abgemess. Mg mg	Volumen der Flüssigkeit ccm	Cc. des Oxalats über den Niederschlag	Cc. des Ammon.-chlorids %	Gefundenes Ca mg
329_7	—	0,85	$^n/_{120}$	1,2	329_6
325_2	—	0,76	$^n/_{120}$	1,2	324_5
323_6	—	0,74	$^n/_{200}$	1,4	322_2
226_6	1133	1,20	$^n/_{250}$	1,0	226_4
223_0	1115	1,20	$^n/_{250}$	1,0	224_4
222_4	161_4	1,20	$^n/_{200}$	1,0	322_3
306_2	153_1	1,20	$^n/_{200}$	1,0	306_0
320_0	—	2,82	$^n/_{225}$	1,1	318_2
320_6	—	2,51	$^n/_{120}$	1,2	318_0
326_2	—	1,98	$^n/_{200}$	1,0	325_4
324_8	—	2,10	$^n/_{200}$	3,0	324_1
322_0	—	3,72	$^n/_{200}$	3,0	319_5

[1]) Richards und Cattrey und Bisbee, Zeitschr. f. anal. Chem. 28, 1901.

handenen Mg). Dieser Unterschied rührt von Zufälligkeiten der 3. und 5. Analyse her. Wenn die Konzentration des Ammoniumchlorids geringer ist, wird das Mg stärker absorbiert.

Für die Bestimmung sehr kleiner Mengen ist der wichtigste Umstand, ob man von dem Auswaschen des Niederschlages absehen kann. Die Zahlen der Tabelle II zeigen, daß unter den Umständen, unter denen diese Analysen ausgeführt wurden, dies der Fall war. Bei 6 Ca-Bestimmungen (1 bis 3, 8 bis 10) haben wir 0,0074 mg weniger bekommen (in 9,4 ccm Flüssigkeit) als abgemessen wurde, d. h. 0,0008 mg für 1 ccm der Flüssigkeit. Dieser Wert entspricht, wie wir schon besprochen haben, ungefähr der Löslichkeit des Ca-Oxalats. Wenn wir für die Löslichkeit die höchste erhaltene Zahl ($0{,}001_2$ in 1 ccm) — die jedenfalls zu hoch ist — annehmen, bekommen wir für die Adsorption der Oxalate durch das Calciumoxalat den Wert von 0,15 $^0/_0$. Die Erklärung für diese Tatsache — die den bisherigen Erfahrungen widerspricht — dürfte in der geringen Konzentration der benützten Ammoniumoxalatlösung liegen ($^n/_{25}$), zum Teil darin, daß die Ammoniumoxalatlösung portionenweise der Ca-Lösung zugefügt und Zeit gelassen wurde, bis der Niederschlag nach Zugabe des Oxalats sich abgeschieden hat, so daß der größte Teil desselben bei einem Ca-Überschuß sich gebildet hat. Die Endkonzentration der Oxalate war über den gebildeten Niederschlag sehr gering ($^n/_{100}$ bis $^n/_{200}$). Doch bei Benutzung von $^n/_{25}$-Ammoniumoxalatlösung konnte ich keinen Einfluß auf die Analysenresultate beobachten, ob nun die Oxalatlösung schnell oder in größeren Mengen zugegeben war. Mit höherem Cc. des Ammoniumoxalats wurde die Löslichkeit des Calciumoxalats herabgesetzt, doch mußte eine starke Erhöhung der Oxalatkonzentration vermieden werden, damit die Korrektion für die mittitrierte Oxalatlösung nicht zu hoch ausfällt.

Wir konnten zwei Umstände beobachten, die die Genauigkeit der Ergebnisse beeinflussen. Erstens muß die Ammoniumoxalatlösung frisch hergestellt sein; bei älteren Lösungen — auch bei solchen, deren Titer kaum merklich verändert ist — haben wir höhere und unregelmäßige Werte bekommen. Die Ammoniumoxalatlösung haben wir durch Absättigung reinster Oxalsäure mit Ammoniak hergestellt. Der zweite Umstand,

den man berücksichtigen muß, ist, daß man bei **sehr geringen** Mengen, bei Benutzung von größeren Röhrchen zur Analyse höhere Werte bekommt als bei Benutzung von kleinen. In einem 3,5 ccm fassenden, 6,5 cm langen Quarzröhrchen waren die Analysen bis zu 0,1 mg hinab genau ausgefallen, bei Bestimmung von 0,03 bis 0,06 mg jedoch 0,002 bis 0,003 mg höher als Ca abgemessen wurde. Die Tabelle III zeigt die Analysenresultate in den größeren und kleineren Röhrchen, wobei das Volumen der Flüssigkeit und die Menge der benutzten Reagenzien gleich genommen wurde. Der höhere Wert in den größeren Röhrchen bleibt auch erhalten, wenn der Niederschlag ausgewaschen wird. Wir können keine Erklärung für diese Erscheinung finden. Am Ende wollen wir noch erwähnen, daß für die Ausführung der Ca-Bestimmung unbedingt Quarzröhrchen, Quarz- oder Platintiegel zu gebrauchen sind. Bei Benutzung von Glas- und Porzellangeräten bekommt man häufig um 0,002 bis 0,0005 mg zu hohe, manchmal noch höhere Werte.

Tabelle III.

Abgemessene Ca mg	Abgemessen Mg mg	Volumen der Flüssigkeit ccm	Gefundene Ca mg
Kleine Röhrchen			
$0\ 6_2$	$0{,}218_1$	0,25	$0{,}036_6$
063_7	$0{,}031_8$	0,41	$0{,}064_1$
065_6	$0{,}032_8$	0,44	$0{,}066_1$
065_4	$0{,}032_7$	0,40	$0{,}065_9$
Große Röhrchen			
062_2	—	0,40	$0{,}064_4$
041_2	—	0,32	$0{,}044_1$
039_2	—	0,32	$0{,}041_1$

Auf Grund der bisherigen Ausführungen empfehlen wir zur Bestimmung des Ca folgendes Verfahren: Die Ca-Lösung, deren Ca-Gehalt ungefähr bekannt sein muß, überführen wir, wenn der Ca-Gehalt über 0,1 mg ist, in ein 6,5 cm langes, ungefähr 0,8 bis 0,9 cm breites, 3,5 ccm fassendes Röhrchen von durchsichtigem Quarz; wenn der Ca-Gehalt unter 0,1 mg ist, in ein 2,5 cm langes, 0,4 bis 0,5 cm breites, 0,7 ccm fassendes Röhrchen. Die Lösungen dürfen auf 1 ccm, wenn Mg vorhanden ist, nicht mehr als $^1/_2$ mg Ca enthalten, doch unter

dieser Konzentration sollen sie ein möglichst kleines Volumen haben. Wir machen den Inhalt der Röhrchen mit Ammoniak schwach alkalisch und fügen so viel von einer 20%igen Ammoniumchloridlösung zu, daß die Flüssigkeit nach Zusatz von Ammoniumoxalat 1% Ammoniumchlorid enthält. Dann erhitzen wir die Röhrchen auf dem siedenden Wasserbad und geben so viel $^{n}/_{25}$-Ammoniumoxalatlösung zu, daß die Flüssigkeit in 1 ccm 0,15 bis 0,25 ccm Ammoniumoxalat im Überschuß enthält. Zu den größeren Röhrchen geben wir auf einmal 0,1 ccm, zu den kleinen 0,02 bis 0,03 ccm Oxalatlösung und warten zwischen den einzelnen Portionen ab, bis der Niederschlag sich abscheidet. Die Menge des zugegebenen Ammoniumoxalats wird notiert. Nach wenigen Minuten kann man die Röhrchen aus dem Wasserbad nehmen. Nach $3^1/_2$ bis 5 Stunden wird das Röhrchen stark abzentrifugiert, nachdem man die Wand desselben vorher mit dem Inhalt gut abgespült hat. Jetzt wird das Röhrchen auf der analytischen Wage abgewogen, die klare Flüssigkeit abpipettiert und das Röhrchen wieder gewogen. Bei der Abpipettierung muß man achtgeben, daß der auf der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmende Niederschlag nicht mitgenommen wird. Wenn etwas davon auf der Capillare haften bleibt, kann man das mit einem kleinen Tröpfchen Flüssigkeit auf die Wand des Röhrchens übertragen. Nach dem Wägen wird H_2SO_4 dem Inhalt der Röhrchen zugefügt, auf 60° gehalten und mit $^{n}/_{100}$-$KMnO_4$-Lösung titriert. Auch wenn man dem Ende der Titration nahekommt, kann man mit $^{1}/_{100}$ ccm fortschreiten und nach Beendigung der Titration den kleinen Überschuß des $KMnO_4$ colorimetrisch bestimmen. Den Oxalatgehalt der an dem Niederschlag haftenden Flüssigkeit muß man bei der Berechnung der Resultate nach folgender Formel in Abzug bringen. Die zur Oxydation des Calciumoxalats nötige $KMnO_4$-Lösung ist $= a - \frac{A-a}{B} b$, wo A die gesamten dem zur Analyse verwendeten Ammoniumoxalat entsprechenden Kubikzentimeter $KMnO_4$-Lösung bedeutet, a die bei der Titration verbrauchten Kubikzentimeter $KMnO_4$-Lösung, B das Gewicht der gesamten Flüssigkeit und b das Gewicht der mit dem Ca-Niederschlag zurückbleibenden Flüssigkeit.

Beim Auswaschen des Ca-Oxalatniederschlages — durch

Zentrifugieren und Abpipettieren der überstehenden Flüssigkeit — (oder mit destilliertem Wasser oder auch mit Ammoniaklösung) gehen bei 0,2 bis 0,5 mg Ca 0,002 bis 0,005 mg Ca mit dem Waschwasser (2 bis 3 ccm Waschwasser) verloren, bei Bestimmung von 0,05 bis 0,06 mg Ca 0,001 bis 0,002. Wenn wenig Mg vorhanden ist, kann man das verloren gegangene Ca in folgender Weise bestimmen: Nach Eindampfen der abgenommenen Flüssigkeit und des Waschwassers wird der Rückstand in 0,1 bis 0,2 ccm Wasser aufgenommen, in das Quarzröhrchen übertragen und nach Abzentrifugieren mit 0,2 ccm Wasser einmal ausgewaschen. Durch diese Prozedur entfernt man den größten Teil des Mg. Der sehr geringe Niederschlag wird in einem Tropfen verdünnter HCl gelöst, und der Tiegel, in dem die Flüssigkeit eingedampft war, mit einem Tropfen HCl ausgewaschen, dann nach Zugabe von Ammoniumchlorid und Ammoniumoxalat in 0,15 bis 0,2 ccm Volumen durch Zugabe von Ammoniak das Ca abgeschieden und nach 10 bis 12 Stunden mittels Zentrifugieren mit möglichst kleinen Wassermengen ausgewaschen. Wenn das vorhandene Mg nicht über 0,2 mg beträgt, sind die Resultate genau. Die später mitgeteilten Blutanalysen wurden zum Teil auf diese Weise ausgeführt. Bei Vorhandensein von viel Mg sind die erhaltenen Werte hoch. Wenn man ammoniumoxalathaltiges Wasser zum Auswaschen des Niederschlages benutzt, sind die Verluste geringer (ungefähr 0,002 mg), doch fallen die Resultate ohne Auswaschen des Niederschlages so genau aus, daß das Suchen nach einem anderen Verfahren unnötig schien.

Für die Bestimmung des Mg habe ich mehrere Verfahren ausprobiert. Durch Ausfällen des Mg in neutralen und ammoniumsalzfreien Lösungen mit NaOH oder mit $Ba(OH)_2$ und Titrierung des ausgefallenen $Mg(OH)_2$ konnte ich keine gut übereinstimmenden Resultate bekommen. Manchmal waren die Resultate entsprechend, dann, ohne daß ein Grund dafür gefunden werden konnte, sind Fehler von 10 bis 30% vorgekommen. Durch Titrieren des Mg mit Seifenlösung habe ich bei sehr kleinen Mg-Mengen gute Resultate bekommen, bei 0,1 mg waren die Schwankungen schon größer. Doch als ein schnell durchführbares, einfaches Verfahren, das doch annähernde Resultate gibt, will ich kurz folgendes beschreiben. Zu der

Titration wird eine Na-Oleinicumlösung (hergestellt aus reinster Oleinsäure) verwendet, von der 1 ccm ungefähr 0,1 bis 0,05 mg Mg entspricht. Der Seifenlösung und ebenso der Mg-Lösung wird eine kleine Quantität verdünnte Natronlauge zugesetzt[1]), so daß sie von Phenolphthalein rosa gefärbt wird. Die Titration wird in dem für die Ca-Bestimmung benutzten größeren Röhrchen durchgeführt, das Ende dadurch erkannt, daß man nach Zugabe der Seifenlösung mit Gummiballon und Capillare in die Lösung hineinbläst. Wenn die Seife in Überschuß vorhanden ist, füllt sich das Röhrchen mit aus kleinen Blasen bestehendem Schaum; während sie sich bis dahin wie destilliertes Wasser verhält. Das Ende der Titration ist scharf; jedoch auch zum destillierten Wasser muß man, damit Schaumbildung eintrete, beträchtliche Mengen der Seifenlösung zufügen, und darum muß das Volumen der Lösung nach der Titration abgemessen und die entsprechende Menge der Seifenlösung in Abzug gebracht werden. Die Veränderung der Alkalinität in kleinerem Maße, ebenso das Vorhandensein von soviel NaCl, als man bei der Analyse von tierischen Substanzen erwarten kann, beeinflussen die Resultate nicht. Doch fallen sie, wenn man die Seifenlösung schneller oder langsamer zufügt, sehr verschieden aus, und aus diesem Grunde kann man schon bei 0,06 bis 0,08 mg Mg keine guten Resultate erzielen. Die Tabelle IV dient als Beispiel, wie weit die Resultate entsprechen. Das destillierte Wasser war Ca-frei. Wenn wir zu einer 0,04 mg Mg enthaltenden Lösung, statt langsam vorzugehen, auf einmal 0,60 ccm Seifenlösung zugegeben haben, ist die verbrauchte Seifenlösung von 0,70 auf 0,79 gestiegen.

Gute Resultate konnten wir für Mg durch Ausfällen als $Mg(H_4N)PO_4$ und Bestimmung des in dem Niederschlag enthaltenen P erreichen. Das Verfahren ist komplizierter als die Ca-Bestimmung, doch sind die einzelnen Operationen schnell ausführbar und die Analyse nimmt bedeutend weniger Zeit in Anspruch als das gravimetrische Verfahren im großen. Zunächst werden wir die Phosphorsäurebestimmung beschreiben.

Die Phosphorsäure wird nach zweimaliger Ausfällung mit Ammoniummolybdat nach Woy durch Titrieren mit $^n/_{10}$-Natron-

---

[1]) Nach I. Bang.

Tabelle IV.

Abgemessen Mg	Verbrauchte Seifenlösung
0,01 mg	0,191 ccm
0,01 „	0,195 „
0,02 „	0,367 „
0,02 „	0,364 „
0,04 „	0,707 „
0,04 „	0,695 „
0,06 „	0,964 „
0,06 „	1,03 „
Abgemessenes destill. Wasser	
0,75 ccm	0,035 „
1,60 „	0,070 „
2,3 „	0,100 „

lauge bestimmt. Ich bin der Vorschrift von Treadwell[1]) gefolgt, habe aber statt 50 ccm 0,5 ccm Volumen genommen. Für die Durchführung der Fällung und Titration werden die bei der Ca-Bestimmung benutzten größeren Röhrchen verwendet. Die nötige Menge von Ammoniummolybdat wurde in einem gleichen Röhrchen abgemessen, im Wasserbade erhitzt und in der ebenso erhitzten Mischung durch eine Capillare mit enger Öffnung im Strahl eingespritzt. Die zweite Fällung wird mit der Salpetersäure ebenso vorgenommen. Die nötigen Mengen der einzelnen Reagenzien zeigt die folgende nach Treadwell zusammengestellte Tabelle.

Tabelle V.

Zur Fällung von mg P	Man verwende Ammonium-molybdat ccm	Ammonium-nitrat ccm	Salpetersäure ccm
0,200	60	0,24	0,14
0,160	52	0,23	0,13
0,120	40	0,22	0,12
0,080	30	0,21	0,11
0,040	15	0,20	0,10
0,020	15	0,20	0,10
0,010	10	0,15	0,05

[1]) Lehrbuch d. analyt. Chemie 2, 7. Aufl., S. 371.

Der Niederschlag wird durch die Zentrifuge 1 mal mit dem vorgeschriebenen Waschwasser, dann 3 mal mit 1 %iger KNO_3-Lösung gewaschen. Dann wird in überschüssiger $^n/_{10}$-Natronlauge gelöst, mit Phenolphthalein versetzt und mit $^n/_{25}$-Salzsäure aus einer in $^1/_{100}$ ccm eingeteilten Bürette zurücktitriert. Man muß den Niederschlag mit großer Tourenzahl abzentrifugieren, sonst bleibt ein Teil des Niederschlages auf der Oberfläche schwebend.

Eine Na_2HPO_4-Lösung, die nach gravimetrischer Bestimmung in einer 10 mal konzentrierteren Lösung in 1 ccm = 0.1012 mg P enthielt, hat nach obigem Verfahren folgende Werte gegeben:

Tabelle VI.

Abgewogene Phosphatlösung g	Umgerechnet auf g	Verbrauchte NaOH-Lösung ccm
$0{,}810_5$	0,800	0,607
$0{,}801_5$	0,800	0,605
$0{,}502_0$	0,500	0,379
$0{,}502_5$	0,500	0,377
$0{,}201_0$	0,200	0,159
$0{,}202_0$	0,200	0,159
$0{,}104_0$	0,100	0,082

Der Titer der benutzten $^n/_{10}$-Lauge war 1 ccm = 0,998 $^n/_{10}$, berechnet aus den für 0,8 und 0,5 g bekommenen Werten und entspricht 1 ccm Lauge = $0{,}133_7$ mg P[1]). Treadwell gibt $0{,}134_9$ mg an[2]), doch bemerkt er, daß man die Natronlauge z. B. bei Bestimmung des P im Stahl, mit dem gravimetrisch bestimmten P einstellen muß.

Bei kleineren P-Mengen sinkt der 1 ccm Lauge entsprechende P bedeutend, welcher Umstand bei der Berechnung unbedingt berücksichtigt werden muß.

Zur Fällung des Mg bin ich der von Schmitz angegebenen Vorschrift gefolgt (nach Treadwell). Die Bestimmungen werden in den größeren und kleineren Quarzröhrchen ausgeführt. Zu der sauren Lösung habe ich ungefähr die doppelte Menge des

---

[1]) Es wurde der Unterschied in dem spezifischen Gewicht der P-Lösung und des destillierten Wassers vernachlässigt.

[2]) l. c. S. 506.

zum Ausfällen des Mg nötigen Na_2HPO_4 zugefügt und nach Zugabe von etwas Phenolphthalein im Wasserbade erhitzt und dann so viel 2,5 %iges Ammoniak zugesetzt, bis die Flüssigkeit merklich rosafarbig wurde, dann eine $^1/_5$ der Flüssigkeit entsprechende Menge 10 %igen Ammoniaks. Die benutzte Na_2HPO_4-Lösung hat 1 mg P in 1 ccm enthalten. Nach 4 bis 5 Stunden wurde bei größeren Mengen von Mg der Niederschlag 4 mal mit 0,3 bis 0,4 ccm 2,5 %igem Ammoniak mittels Zentrifuge gewaschen. Bei kleinen Mengen — man kann aber ebenso auch bei größeren Mengen verfahren — wurde die zugegebene Phosphatlösung genau abgemessen, das Gewicht der Röhrchen vor und nach dem Abpipettieren der klaren Flüssigkeit bestimmt und der in der mitgewogenen Lösung zurückbleibende P sowie das Oxalat bei der Ca-Bestimmung durch Rechnung ermittelt. Der Niederschlag, im HNO_3 gelöst, wurde zur P-Bestimmung verwendet,

Ich habe den $Mg(NH_4)PO_4$-Niederschlag in der Flüssigkeit, von der er sich abscheidet oder in 2,5 % Ammoniak kaum merklich löslich gefunden. Doch wegen des an der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmenden Niederschlages, von dem Teile bei der Berührung der Oberfläche in der Flüssigkeit niedersinken, waren Verluste beim Waschen mittels Zentrifuge nicht vermeidbar, und ich halte dafür, den Niederschlag nicht auszuwaschen. Wahrscheinlich wäre das Geeignetste, den Niederschlag auf entsprechenden Filtern zu waschen.

Tabelle VII.

Abgewogenes Mg	Gefundenes Mg
Der Niederschlag wurde gewaschen.	
0,099 mg	$0{,}099_4$ mg
0,099 „	$0{,}099_0$ „
$0{,}019_6$ „	$0{,}018_9$ „
$0{,}019_6$ „	$0{,}018_5$ „
Der Niederschlag wurde nicht gewaschen.	
$0{,}099_1$ mg	$0{,}099_5$ mg
$0{,}098_7$ „	$0{,}100_4$ „ [1])
$0{,}019_6$ „	$0{,}019_6$ „
$0{,}032_5$ „	$0{,}031_5$ „

[1]) Der Molybdänniederschlag hat sich nicht schön krystallinisch ausgeschieden.

Die bei den mitgeteilten Analysen verwendete Ca-Lösung wurde durch Auflösen des reinsten $CaCO_3$ in HCl und die Mg-Lösung durch Lösen von krystallinischem $MgSO_4$ hergestellt. Die mitgeteilten Analysen stellen komplette Analysenreihen dar.

Bei der Analyse der tierischen Organe und des Blutes muß man Ca und Mg neben den organischen Substanzen von Fe und P trennen. Die neben den Alkalisalzen anwesenden anderen Substanzen (Si, Mn) sind zum Teil in sehr kleinen Mengen vorhanden, zum Teil werden sie während der Analyse abgeschieden. Wenn man kleine Mengen tierischer Substanzen aufarbeitet (0,5 bis 2 g feuchtes Gewicht), verursacht die Veraschung keine Schwierigkeit. Nur muß man darauf achten, daß die Veraschung bei möglichst niedriger Temperatur geschehe (die Asche darf nicht schmelzen), sonst hat man mit dem Auflösen der Asche Schwierigkeiten. Das Auflösen gelingt leicht mit 1 Tropfen konz. HCl und einigen Tropfen dest. Wasser auf dem Wasserbade. Wenn das Fe nicht in Lösung geht, muß man den Inhalt des Tiegels mehrmals mit 1 Tropfen konz. HCl und einigen Tropfen Wasser eindampfen. Nach gelungener Lösung wird die HCl verdampft, der Rückstand mit 1 Tropfen verdünnter HCl ($^n/_4$) und einigen Tropfen Wasser aufgenommen, in das Quarzröhrchen überführt und 5- bis 6 mal mit 4 bis 5 kleinen Tropfen Wasser nachgespült.

Das Volumen der Flüssigkeit in den Quarzröhrchen kann 1 bis 2 ccm sein. Dann fügen wir 0,2 bis 0,4 ccm konz. Ammoniumacetatlösung zu und tropfenweise so viel Fe_2Cl_6-Lösung, bis die Flüssigkeit sich stark färbt. Dann wird das Röhrchen im Wasserbade erhitzt, bis das Fe sich vollständig abscheidet (5 bis 10 Minuten), nachher kühlen wir die Röhrchen unter der Wasserleitung ab. Dann zentrifugieren wir sie und wägen sie auf der analytischen Wage, pipettieren die klare Flüssigkeit in einen Quarz- oder Platintiegel ab und wägen das Röhrchen wieder. Die Menge des Ca und Mg, die bei dem Eisenniederschlag zurückbleibt, wird rechnerisch ermittelt.

Das Fe scheidet sich gewöhnlich nicht vollständig ab, es bleiben 10 Tausendstel bis 1 bis 2 Tausendstel mg in Lösung. Doch spielt das im folgenden keine Rolle. Das Eisen wird mit dem Ca-Oxalat abgeschieden, doch nicht als Oxalat, und vermehrt den $KMnO_4$-Verbrauch nicht. Die abpipettierte Lösung

dampfen wir ein, verjagen vorsichtig die Essigsäure und die Ammonsalze und verbrennen die ausgeschiedene Kohle bei möglichst niederer Temperatur. Starkes Erhitzen ist unbedingt zu vermeiden, sonst kann man das Ca kaum in Lösung bringen. Den Rückstand lösen wir in 1 Tropfen verdünnter HCl, und zum Ausfällen des Ca bringen wir sie mit möglichst wenig Wasser (0,2 bis 0,3 ccm) in das Quarzröhrchen. Die von dem Ca-Oxalat abgenommene Flüssigkeit wird abgedampft und die Ammonsalze verjagt. Wenn wir das Mg mit Seife bestimmen wollen, ist das Vertreiben der Ammonsalze unerläßlich, und der Rückstand wird, nach Eindampfen mit 1 Tropfen verdünnter HCl, in Wasser aufgenommen. Wenn das Mg als Phosphat bestimmt wird, kann das Verjagen der Ammonsalze unterbleiben. In dem den Ferriphosphat und basisches Ferriacetat enthaltenden Niederschlag kann der P nach dem beschriebenen Verfahren bestimmt werden.

Von meinen Analysen teile ich einige Ca-Bestimmungen in Blut und Blutplasma mit. Das Plasma wurde durch rasches Abkühlen und Zentrifugieren des Blutes hergestellt. Die Blutaschelösung rührt von Blutproben her, von denen das Serum teilweise abpipettiert wurde.

Tabelle VIII.

Blut I.

Abgemessen	Gefunden Ca	
1,566 g Blut	in 1 ccm Blut	$0{,}062_7$ mg
0,979 „ Plasma	„ 1 „ Plasma	$0{,}088_6$ „
1,371 „ Blutkörperchen (Rückstand nach Abnahme des Plasma)	„ 1 „ Blut (berechnet aus Plasma und Blutkörperchen)	$0{,}063_0$ „

Blut II.

Abgemessen	Gefunden Ca	
2,657 g Blut	in 1 ccm Blut	$0{,}052_5$ mg
1,794 „ „	„ 1 „ „	$0{,}053_0$ „
1,042 „ Plasma	„ 1 „ Plasma	$0{,}095_3$ „
1,253 „ Blutkörperchen wie bei Blut I	„ 1 „ Blut berechnet wie bei Blut I	$0{,}053_5$ „

Blut III.

Abgemessen	Gefunden Ca
0,600 g Plasma	in 1 ccm Plasma $0{,}094_5$ mg
1,223 g „	„ 1 „ „ $0{,}095_8$ „

Blutaschelösung.

Abgemessen	Gefunden Ca	Gefunden Mg
0,396 ccm	$0{,}038_7$ mg	$0{,}032_4$ mg
0,396 „	$0{,}039_4$ „	$0{,}032_0$ „
0,792 „	$0{,}071_5$ „	$0{,}062_6$ „
0,792 „	$0{,}071_5$ „	$0{,}064_6$ „
1,477 „	$0{,}133_8$ „	

(berechnet auf 0,792 g Ca 0,071 mg).

Die Bestimmungen wurden bei allen in der Tabelle mitgeteilten Analysen in den größeren Röhrchen ausgeführt; davon rührt der erhöhte Wert bei 0,4 ccm Blutaschelösung her. In derselben Lösung wurden die mitgeteilten Mg-Bestimmungen durch Titrierung mit Seifenlösung ausgeführt.

Quantitative Messungen über die Spaltung des Hexamethylentetramins.

Von

Paul Trendelenburg.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 13. April 1919.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

An der Tatsache, daß Hexamethylentetramin an sich keine keimtötenden Eigenschaften besitzt, sondern diese erst unter dem Einfluß einer bestimmten Eigenschaft des Lösungsmittels zur Entfaltung bringt, gehen Lehrbuch und Praxis fast ausnahmslos vorüber, ohne sie zu beachten, obwohl sie sich schon aus den ersten Versuchen Nicolaiers[1]), der dieses Mittel bekanntlich in die Therapie einführte, ergibt.

Wie schon Nicolaier betont, ist es die im Molekül versteckte Komponente Formaldehyd, die, freigemacht, keimtötend wirkt. Der Zerfall von Hexamethylentetramin in Formaldehyd und Ammoniak geht aber nur bei saurer Reaktion in nennenswertem Ausmaß vor sich, während bei alkalischer Reaktion Formaldehyd mit Ammoniak synthetisch Hexamethylentetramin bildet ($C_6H_{12}N_4 + 6\,H_2O \rightleftarrows 6\,CH_2O + 4\,NH_3$).

Daß Hexamethylentetramin selbst in mehrprozentiger Lösung tatsächlich nicht keimtötend wirkt, solange nur durch Alkalizusatz die Formaldehydabspaltung verhindert wird, und daß die Formaldehydabspaltung an die saure Reaktion des Lösungsmittels (des Urins) gebunden ist, zeigten neuerdings Hanzlic und Collins[2]) in ausführlichen Versuchsreihen — aber

[1]) A. Nicolaier, Experimentelles und Klinisches über Urotropin. Zeitschr. f. klin. Med. **38**, 350, 1899.

[2]) P. J. Hanzlic und R. J. Collins, Hexamethylentetramin: Abspaltung von Formaldehyd und antiseptische Kraft unter verschiedenen

auch ihre Versuche beschränkten sich auf die qualitative Feststellung, so daß es mir wünschenswert schien, durch weitere Versuche die quantitative Abhängigkeit der Hexamethylentetraminzerlegung von der Reaktion des Lösungsmittels sicherzustellen. Da wir durch Arbeiten des letzten Jahrzehnts über die Reaktion der wichtigsten Körperflüssigkeiten genau unterrichtet sind, war zu erwarten, daß solche quantitative Messungen vielleicht Hinweise für eine rationelle Anwendung des Hexamethylentetramins ergeben würden[1]).

Methode.

Da Hexamethylentetramin eine Base ist und da bei seiner Zersetzung die Reaktion der Lösung infolge Bildung des viel stärker basischen Ammoniaks die Neigung hat, sich nach der alkalischen Seite hin zu verschieben, war es unstatthaft, für die quantitative Messung des Einflusses von Acidität und Basicität auf die Hexamethylentetraminzersetzung von Lösungen der Substanz in Säuren und Basen wechselnder Stärke oder wechselnder Normalität auszugehen; die Reaktion einer 1⁰/₀igen Hexamethylentetraminlösung in 0,1 n-HCl nimmt z. B. sehr bald infolge steigender Ammoniakbildung an Acidität ab. Um die Reaktion der Lösungen während der ganzen Versuchsdauer möglichst konstant zu halten, wurden deshalb Sörensensche Puffergemische, Gemische aus freien Säuren und zugehörenden Alkalisalzen usw. verwendet. Die Zusammensetzung derselben und die Konzentration des Hexamethylentetramins wurde so bemessen, daß die Verschiebung der Reaktion während der Versuchsdauer innerhalb ganz enger Grenzen blieb.

---

chemischen und biologischen Bedingungen. Investigations of the therap. research comittee of the council of pharmacy and chemistry of the american medical association 2, 11, 1913, und Archives of internal medicine 12, 578, 1912. Vgl. auch Fr. Hinman, Der Wert des Hexamethylentetramins als inneres Antisepticum in anderen Körperflüssigkeiten als dem Urin. Archives of internal medicine 13, 841, 1914.

[1]) Aus einem Referat im Chemischen Zentralblatt 77, 1087, 1906 entnehme ich, daß R. Ischidzu und T. Inouye (Journ. of Pharmac. Soc. of Japan) Versuche über die Hexamethylentetraminzersetzung durch verschieden starke Säuren ausführten. Die Originalarbeit war mir nicht zugänglich.

Alle Versuche wurden bei 38° durchgeführt, die Dauer betrug maximal 6 Stunden.

Der aus dem Hexamethylentetramin abgespaltene Formaldehyd gibt, wie erwähnt, den Lösungen die keimtötende Eigenschaft. Es lag deshalb nahe, jeweils die Mengen freigewordenen Formaldehyds unmittelbar zu analysieren. Aber dahin gerichtete Versuche stießen auf große Schwierigkeiten. Die genauen quantitativen Formaldehydbestimmungen, z. B. die Romijnsche Methode[1]), oder die in das Deutsche Arzneibuch aufgenommene Lemmesche Methode geben zwar mit reinen wäßrigen Formaldehydlösungen sehr gute Ergebnisse — sie versagen aber, wenn neben dem nachzuweisenden Formaldehyd Ammoniumsalze vorhanden sind. Diese Methoden arbeiten bei natronalkalischer Reaktion: daher verbindet sich ein Teil des freigewordenen Ammoniaks rückläufig mit Formaldehyd zu Hexamethylentetramin, und die erhaltenen Werte fallen, wie ich durch Kontrollversuche feststellte, viel zu gering aus. Ebenso unbefriedigend verliefen Versuche, die Additionsprodukte, die sich bei Zugabe von Anilinwasser oder Hydrazinsalzlösung bilden, abzuscheiden und zur Wägung zu bringen; schon bei rein wäßrigen, einigermaßen verdünnten Formaldehydlösungen haben diese Methoden sehr weite Fehlergrenzen, sie sind bei Gegenwart von Ammoniumsalzen ganz unquantitativ.

Deshalb wurde von einer unmittelbaren Formaldehydbestimmung in den Systemen Hexamethylentetramin + Formaldehyd + Ammoniumsalz abgesehen und zunächst nur die Menge des zerlegten Hexamethylentetramins bestimmt. Zwei Wege standen offen: einmal die Messung des übrigbleibenden Hexamethylentetramins und zweitens die Bestimmung der gebildeten Ammoniakmenge.

Hexamethylentetramin wird durch Sublimatlösung auch aus recht verdünnten Lösungen quantitativ gefällt. Der Versuch, aus der nach Kjehldahl bestimmten N-Menge des abfiltrierten Niederschlags Auskunft über die in der Lösung vorhanden gewesene Hexamethylentetraminmenge zu erhalten, schlug aber fehl, da Sublimat bei Gegenwart von Chloriden,

---

[1]) G. Romijn, Über die Bestimmung des Formaldehyds, Zeitschr. f. anal. Chem. 36, 18, 1897.

also auch von Ammoniumchlorid, das in den meisten Reaktionsgemischen zugegen war, nicht quantitativ fällt und daher ein sehr großer Prozentteil des Hexamethylentetramins sich der Analyse entzieht[1]).

Es gelang dagegen, auf folgende Weise den aus dem Hexamethylentetramin freigewordenen Ammoniak neben unzersetzter Substanz und neben Formaldehyd quantitativ zu bestimmen. Das Reaktionsgemisch wurde in siedende starke Natronlauge gegeben; diese läßt Hexamethylentetramin, wie ich bei Kontrollversuchen fand, völlig unverändert und spaltet aus ihm keinen Ammoniak ab[2]), dagegen wird Formaldehyd von ihr so rasch oxydiert, daß es sich nicht mit gleichzeitig zugegebenem Ammoniak zu Hexamethylentetramin verbinden kann. Wie die auf S. 162 mitgeteilten Kontrollversuche, bei denen Formaldehyd + Ammoniumsalzlösung in die siedende Natronlauge getropft wurde, zeigen, geht die gesamte zugegebene Ammoniakmenge unvermindert in das Destillat über.

Die Apparatur bestand aus einem mit etwa 100 ccm ca. 5 $^0/_0$iger Natronlauge beschickten Kjeldahlkolben, in dessen Hals ein Tropftrichter und ein mit Liebigschem Kühler und Vorlage verbundener Destillieraufsatz eingefügt war. Aus dem Tropftrichter wurde die auf NH_3 zu untersuchende Mischung in die lebhaft siedende Lauge eingetropft, nachdem die Vorlage mit 0,1 n-HCl beschickt worden war; der Tropftrichter wurde mit destilliertem Wasser nachgespült.

Die auf diese Weise erhaltenen Hexamethylentetraminzersetzungskurven bedurften noch einer Ergänzung. Neben der Gleichung 1 Hexamethylentetramin = 6 Formaldehyd + 4 Ammoniak können unter gewissen Bedingungen andere Spaltungen verlaufen, die zu Methylamin oder Kohlensäure führen[3]). In diesem Falle würde also die freigemachte

---

[1]) Vgl. hierzu F. Schröter, Zur Methodik der quantitativen Bestimmung des Hexamethylentetramins (Urotropins) im Harn, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 64, 161, 1911.

[2]) Die Beständigkeit des Hexamethylentetramins gegen siedende starke Natronlauge wurde auch von A. Wöhlk (Zur Untersuchung des Urotropins [Hexamethylentetramins], Zeitschr. f. anal. Chem. 44, 765, 1905) nachgewiesen.

[3]) Vgl. die angeführte Arbeit von R. Ischidzu und T. Inouye.

Formaldehydmenge hinter der theoretisch möglichen Menge zurückbleiben. Um darüber Auskunft zu erhalten, ob solche Nebenreaktionen unter meinen Versuchsbedingungen in erheblichem Maße vorkommen, wurde in den Versuchen der 1. bis 7. Reihe wiederholt das Destillat auf Methylamin (Geruchsprobe nach Zusatz von NaOH und Erwärmen) geprüft; es war in keinem Falle Methylamin nachzuweisen. Zweitens wurde nunmehr die freigemachte Menge Formaldehyd colorimetrisch bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die zu prüfende, gegebenenfalls verdünnte Lösung mit gleichen Teilen einer Lösung von 1% Phloroglucin in 33% Natronlauge[1]) zugesetzt. Formaldehyd gibt mit dieser Jorissenschen Phloroglucinlösung eine schöne Rotfärbung, die eine quantitative Messung ermöglicht, da ihre Kraft und die Zeit bis zu ihrem Auftreten der Formaldehydkonzentration parallel geht. Da ich bei den Versuchen, den Formaldehyd in den Reaktionsgemischen chemisch zu bestimmen, gesehen hatte, daß diese Substanz in kalter, natronalkalischer Lösung nicht quantitativ nachzuweisen war, da ein Teil derselben sich mit dem aus dem Ammoniumsalz des Reaktionsgemisches freigewordenen Ammoniak rückläufig zu Hexamethylentetramin verband, vermutete ich, daß auch die Jorissensche Probe bei Anwesenheit von Ammoniak zu kleine Werte liefern würde. Dies ist tatsächlich der Fall[2]): Formaldehyd + Ammoniumsalz in der aus der Gleichung folgenden Menge gibt mit dem Reagens eine erheblich schwächere Färbung als Formaldehyd allein. Aus diesem Grund wurde die colorimetrische Formaldehydbestimmung folgendermaßen ausgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer Lösung verglichen, die neben der vollen, aus der zuvor gewonnenen

---

[1]) 33%ige NaOH ist der bisher immer empfohlenen 10- bis 15%igen NaOH vorzuziehen. In ihr löst sich das Phloroglucin nicht wie in jener mit violetter Farbe auf, sondern die Lösung ist und bleibt farblos, wodurch die Schärfe der Reaktion gewinnt. Über die Violettfärbung von Phloroglucin in 15%iger NaOH auszuführen, vgl. E. Salkowski, Zum Verhalten des Urotropins und Formaldehyds im Organismus, diese Zeitschr. 87, 143, 1918.

[2]) Hieraus folgt, daß die neuerdings wiederholt empfohlene Methode, Formaldehyd im Harn durch Colorimetrie mit Jorissenschem Reagens quantitativ zu messen, unzuverlässig ist.

Hexamethylentetraminzersetzungskurve bestimmten, in der jeweils vorliegenden Probe des Reaktionsgemisches enthaltenen Ammoniumsalzmenge 100, 90, 80 und 70% der nach der Gleichung maximal möglichen Formaldehydmenge enthielt. Alle Versuche fielen eindeutig aus: stets enthielt das Reaktionsgemisch sicher mehr als 70 oder 80% der theoretisch möglichen Formaldehydmenge, meist bestand Farbgleichheit mit der 100%igen Vergleichslösung, gelegentlich mit der 90%igen. Unter meinen Versuchsbedingungen wird also das Hexamethylentetramin sicher zum ganz überwiegenden Anteil nach der Gleichung $C_6H_{12}N_4 + 6\,H_2O = 6\,CH_2O + 4\,NH_3$ gespalten, Nebenreaktionen sind nicht nachweisbar.

Spaltung des Hexamethylentetramins in Lösungen abnehmender Acidität.

Die Ergebnisse der ersten 9 Versuchsreihen, deren analytische Daten im experimentellen Teil der Arbeit mitgeteilt werden, sind in Kurve 1 und 2 graphisch dargestellt.

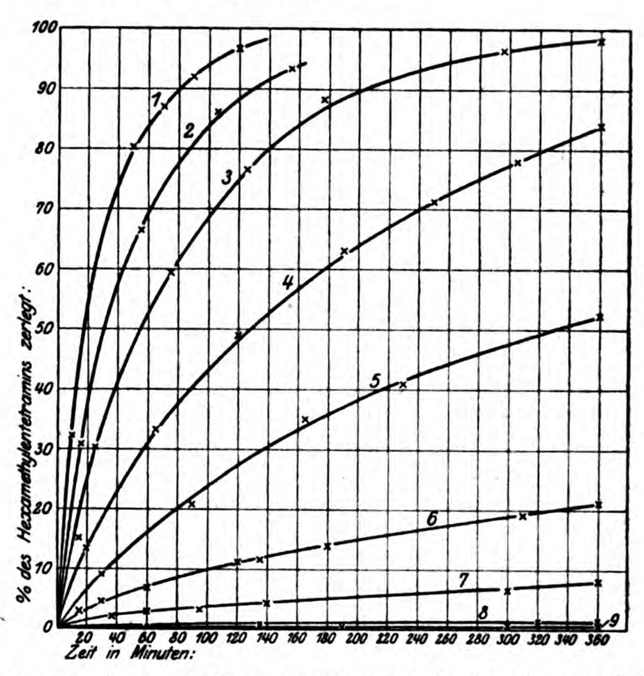
In Kurve 1 sind auf der Abszisse die Zeiten in Minuten (Ende der Versuche maximal nach 6 Stunden) und auf der Ordinate die Prozente zersetzten Hexamethylentetramins eingezeichnet, zu jeder Kurve ist weiter die zugehörende Acidität, ausgedrückt als Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration = p_H, angegeben[1]). Kurve 2 ist aus den gleichen Ordinatenwerten gewonnen, doch sind auf der Abszisse hier die Logarithmen der Wasserstoffionenkonzentration wiedergegeben; einige physiologisch wichtige Wasserstoffionenwerte wurden eingetragen.

Aus beiden Kurven ist die starke Abhängigkeit der Hexamethylentetraminzerlegung von der Wasserstoffionenkonzentration klar zu erkennen: ist z. B. die H-Ionenkonzentration 0,1 n (p_H also = 1,0), so werden in 6 Stunden etwa gerade 100% der Substanz zerlegt, in 0,001 n-H-Ionen (p_H also 3,0) sinkt der zersetzte Anteil auf etwa 43%, in 0,00001 n (p_H =

---

[1]) Die Bestimmung der H-Ionenkonzentration wurde durch Colorimetrie nach Indicatorenzusatz (Sörensen) ausgeführt. Die Vergleichspuffergemische konnte ich im technologischen Institut bei Herrn Prof. Riesenfeld auf ihren richtigen H-Ionenwert elektrometrisch prüfen; Herrn Prof. Riesenfeld danke ich auch hier für seine Unterstützung.

5,0) auf etwa 10 %, um bei neutraler Reaktion ($p_H = 6{,}75$) die Abszisse fast zu erreichen.



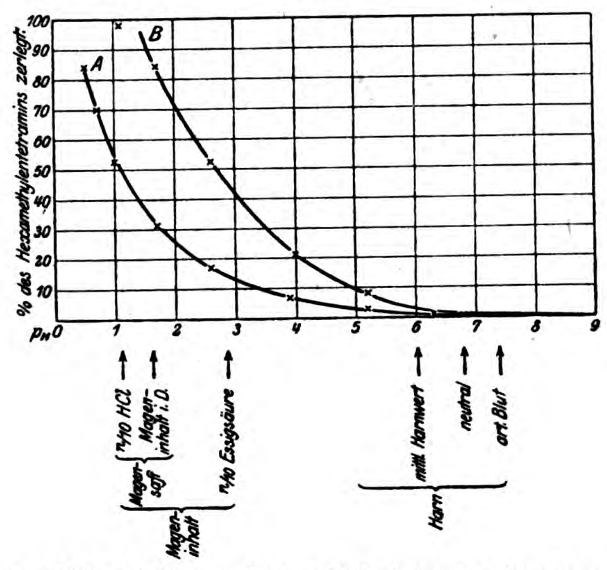
Kurve 1. Zersetzung des Hexamethylentetramins in Lösungen fallender Azidität, bei 38°.

Ordinate: % des Hexamethylentetramins zerlegt.
Abszisse: Zeit in Minuten.

Kurve	1 : p_H	zu Beginn	= 0,5 ;	am	Ende	0,6
„	2 : „	„ „	= 0,7	„	„	0,8
„	3 : „	„ „	= 1,0	„	„	1,1
„	4 : „	„ „	= 1,7	„	„	1,7
„	5 : „	„ „	= 2,6	„	„	2,6
„	6 : „	„ „	= 3,9	„	„	4,0
„	7 : „	„ „	= 5,2	„	„	5,2
„	8 : „	„ „	= 6,3	„	„	6,3
„	9 : „	„ „	= 6,75	„	„	6,75.

Aber auch bei genau neutraler Reaktion (wie sie in der 9. Reihe des experimentellen Teiles vorlag) wird noch ein quantitativ meßbarer Anteil des Hexamethylentetramins gespalten: nach 60 Minuten sind 0,3 und nach 360 Minuten 0,9 % gespalten. Da es wegen der schwach alkalischen Reaktion mancher Körperflüssigkeiten (s. unten) von Wichtigkeit war,

das Verhalten der Substanz noch weiter im alkalischen Gebiet zu verfolgen, wurden geeignete, zunehmend alkalische Puffergemische mit Hexamethylentetramin versetzt und mit der sehr empfindlichen Phloroglucinprobe, die eine Formaldehydkonzentration 1:1000000 noch anzeigt, auf Formaldehydabspaltung geprüft. Betrug p_H zwischen 6,75 (= neutral) und 8,75 (erheb-



Kurve 2. Abhängigkeit der Hexamethylentetraminzerlegung von der H-Ionenkonzentration.

Ordinate: % des zugegebenen Hexamethylentetramins zerlegt
A.: nach 1 Stunde bei 38°;
B.: nach 6 Stunden bei 38°.

Abszisse: Logarithmen der H-Ionenkonzentrationen.

liche Rosafärbung mit Phenolphthalein!), so fiel die Reaktion sowohl 6 Stunden wie 1 Stunde nach Beginn positiv aus. Bei p_H 9,0 war der Ausfall der Probe nach 1 Stunde negativ, nach 6 Stunden positiv, und erst bei p_H 9,1 konnte auch nach 6 Stunden langer Beobachtungszeit kein Formaldehyd mehr nachgewiesen werden (vgl. experimenteller Teil).

Hiernach wird Hexamethylentetramin, entgegen der meist geäußerten Ansicht, auch noch bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion der Lösung in geringem Umfang gespalten. Dies Ergebnis deckt sich mit

den Resultaten, die Hölst[1]) veröffentlichte: er konnte in Puffergemischen, die 0,2 % Hexamethylentetramin enthielten, auch dann Formaldehyd qualitativ (nach Jorissen usw.) nachweisen, wenn p_H der Gemische im alkalischen Gebiet lag; auch in diesen Versuchen lag die Grenze etwa bei p_H 9,0 (Temperatur 37°, mehrstündige Beobachtungsdauer).

Um einen näheren Einblick in die Abhängigkeit der Hexamethylentetraminabspaltung von der H-Ionenkonzentration zu erhalten, wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Hexamethylentetraminzerlegung für die verschiedenen Versuchsreihen berechnet. Ist es doch von zahlreichen Reaktionen, deren Ablauf katalytisch durch Wasserstoffionen beeinflußt wird — ich erinnere nur an die Förderung der Rohrzuckerinversion durch H-Ionen —, bekannt, daß die Geschwindigkeitskonstante in direkter Proportion zur H-Ionenkonzentration steht.

Da die Hexamethylentetraminzerlegung eine monomolekulare Reaktion ist, gilt für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante k die Formel $k = 1/t \log \text{nat} \frac{a}{a-x}$, wobei a die Ausgangskonzentration, x die zur Zeit t zerlegte Menge bedeutet. Wie aus den S. 162 f. mitgeteilten Daten zu ersehen ist, waren die verschieden lange Zeit nach Versuchsbeginn innerhalb jeder Reihe erhaltenen Werte für k nicht ganz gleich groß; stets war ein Gang vorhanden derart, daß k mit zunehmender Zeitdauer etwas kleiner wurde. Die Ursache hierfür liegt zum Teil zweifellos darin, daß trotz der vorhandenen Puffer die Reaktion des Gemisches sich langsam etwas nach der alkalischen Seite hin verschob, die Konzentration des Katalysators also etwas schwächer wurde. Aber da der Gang der k-Werte besonders in den letzten Versuchsreihen bei geringer Acidität und geringer Hexamethylentetraminspaltung besonders ausgesprochen war, hier aber die Reaktionsverschiebung nur außerordentlich gering gewesen sein kann, müssen noch andere, nicht zu erklärende Ursachen (Nebenreaktionen?) im Spiel gewesen sein.

[1]) H. J. Hölst, Über Urotropin als Desinfiziens der Harnwege, Zeitschr. f. klin. Med. 81, 266, 1915.

Immerhin liegen die für verschiedene Zeiten innerhalb jeder Reihe gewonnenen Werte nahe genug beieinander, um die mittleren Geschwindigkeitskonstanten zu den H-Ionenkonzentrationen in Beziehung setzen zu können. Es ergab sich:

Versuchs-reihe	H-Ionen-konzentration	Geschwindigkeits-konstante	(*t*)	$\frac{H}{K}$
1	0,25 n	0,035	(40′)	7,1
2	0,16 n	0,020	(60′)	8,0
3	0,08 n	0,012	(60′—200′)	6,6
4	0,02 n	0,0054	(150′)	3,7
5	0,0025 n	0,0025	(200′)	1,0
6	0,0001 n	0,00075	(250′)	0,13
7	0,0000064 n	0,00024	(360′)	0,03
8	0,0000005 n	0,000082	(135′)	0,006

Entgegen der Erwartung besteht also keine unmittelbare Proportionalität zwischen Geschwindigkeitskonstante und H-Ionenkonzentration; die Geschwindigkeitskonstanten sind vielmehr bei niederer H-Ionenkonzentration weit höher als nach den bei hohen H-Ionenkonzentrationen erhaltenen Werten zu erwarten war.

Folgerungen.

Während seines Durchgangs durch den Körper wirken vier verschieden hohe H-Ionenkonzentrationen auf das Hexamethylentetramin ein; deren Einwirkung sei im folgenden betrachtet.

Die H-Ionenkonzentration im **Mageninhalt** ist in der letzten Zeit häufig gemessen worden, sie liegt meist bei 0,1 bis 0,01 n-H-Ionen [p_H also 1,0 bis 2,0[1])]. In diesem Azidi-

---

[1]) Die H-Ionenkonzentration des menschlichen Magensaftes liegt nach F. Tangl bei 0,02 bis 0,03 g H im Liter (Untersuchungen über die Hydrogenionenkonzentration im Inhalt des nüchternen menschlichen Magens, Arch. f. d. ges. Physiol. **115**, 64, 1906). M. N. Menten fand bei einem Kind mit Magenfistel nach Ösophagusstenosierung 0,12 bis 0,01 (Acidität des unverdünnten normalen Magensaftes bei einem Fall mit Magenfistel, Journ. of Biolog. Chem. **12**, 341, 1915). Werte gleicher Größenordnung beobachteten beim Hunde mit Magenblindsack P. Fraenkel (Die Wasserstoffionenkonzentration des reinen Magensaftes und ihre Beziehungen zur elektrischen Leitfähigkeit und zur titrimetrischen Acidität.

tätsbereich wird Hexamethylentetramin in kurzer Zeit sehr stark gespalten: nach 1 Stunde sind etwa 53 bis 25%, nach 6 Stunden etwa 100 bis 70% des zugesetzten Hexamethylentetramins zerlegt (vgl. Kurve 2). Zweifellos wird also beim Durchgang durch den sauren Mageninhalt ein beträchtlicher Teil der Substanz in Formaldehyd und Ammoniumsalz übergeführt.

Die Reaktion des Darmsaftes liegt, wie Messungen von Auerbach und Pick[1]) ergaben, nicht weit jenseits des neutralen Punktes im alkalischen Gebiet, p_H des Darmsaftes beträgt zwischen 7,5 und 8,0, der Wert liegt dicht bei dem normalen Blutwert. Bei solchen H-Ionenkonzentrationen — durch Phenolphthalein wird Darmsaft nicht oder kaum gerötet! — ist die Hexamethylentetraminspaltung zwar noch vorhanden, aber, wie oben erwähnt wurde, so gering, daß sie nur qualitativ zu fassen ist — mehr als 1% des zufließenden Hexamethylentetramins dürfte vor der Resorption im Dünndarm sicher nicht gespalten werden.

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob die Substanz im zirkulierenden Blute zerlegt wird, denn in diesem Falle könnte den klinischen Versuchen, mit Hexamethylentetramin Septicämien zu heilen, eine experimentelle Grundlage geschaffen werden. Die Reaktion des arteriellen Blutes ist aus zahlreichen Einzelbestimmungen, die mit verschiedenen Methoden erhalten wurden, genau bekannt: das arterielle Blut hat eine

Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. **1**, 431, 1905) und R. Rosemann (Die Wasserstoffionenkonzentration des Magensaftes, Arch. f. d. ges. Physiol. **169**, 188, 1917); nämlich 0,06 bis 0,07 bzw. 0,106 bis 0,16. Aus Angaben und Kurvenbeispielen, die L. Michaelis bringt (L. Michaelis und H. Davidsohn, Die Bedeutung und die Messung der Magensaftacidität, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. **8**, 398, 1911, und L. Michaelis, Die Methode der elektrometrischen Titration und ihre Anwendung auf den Magensaft, diese Zeitschr. **79**, 1, 1917), ergibt sich für den Mageninhalt nach Probefrühstück eine Acidität von meist 0,028 bis 0,0015 n-H-Ionen. Nach Johanne Christiansen (Untersuchungen über die freie und gebundene Salzsäure im Magensaft, I, diese Zeitschr. **46**, 24, 1912) liegt der Durchschnittswert zahlreicher Einzelmessungen bei 0,026 n, der Höchstwert bei 0,074 n-H-Ionen.

[1]) Fr. Auerbach und H. Pick, Die Alkalität von Pankreassaft und Darmsaft lebender Hunde. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt **43**, 155, 1913.

p_H von 7,35 [1]). Pufferlösungen mit dieser H-Ionenkonzentration zerlegen qualitativ nachweisbare Anteile von Hexamethylentetramin, und wenn Blutserum mit 0,5 % Hexamethylentetramin versetzt wird, so ist nach ein- bis mehrstündigem Aufenthalt im körperwarmen Raum Formaldehyd mit der Phloroglucinprobe nachzuweisen. Dagegen ist es bisher noch nicht gelungen, im Blutserum von Tieren, die Hexamethylentetramin einnahmen, Formaldehyd nachzuweisen [2]) — ob die Ursache hierfür in zu niedriger Hexamethylentetraminkonzentration im Blute liegt, oder ob der abgespaltene Formaldehyd im Organismus zu rasch oxydiert wird, ist noch unentschieden. Jedenfalls ist das Problem, die Blutflüssigkeit des lebenden Tieres durch Hexamethylentetraminzufuhr zu sterilisieren, durch weitere experimentelle Arbeit zu verfolgen.

Da das Hexamethylentetramin in alle Körperflüssigkeiten, z. B. Galle, Schweiß, Speichel, Cerebrospinalflüssigkeit, Milch übergeht — ja es soll durch Verfüttern von Hexamethylentetramin bei Hühnern eine dauernde Konservierung der gelegten Eier zu erzielen sein! — und da diese Körperflüssigkeiten sicher nicht nennenswert alkalischer, z. T. sogar saurer als das Blut reagieren, besteht auch für diese die theoretische Möglichkeit einer Sterilisation; doch ist es bisher nicht gelungen, in den genannten Flüssigkeiten nach Einnahme von Hexamethylentetramin Formaldehyd aufzufinden, während Liquor cerebrospinalis, Ascites, Zysteninhalt, denen $^1/_{10}$ bis $^1/_2$ % Hexamethylentetramin zugesetzt worden war, nach ein- bis fünfstündigem Stehen bei 37,5° positive Formaldehydreaktion geben [3]).

---

[1]) Z. B. K. A. Hasselbalch, Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlensäure derselben und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl, diese Zeitschr. 78, 112, 1916.

[2]) P. J. Hanzlic und R. J. Collins, a. a. O. In eigenen Versuchen konnte ich hingegen diese Formaldehydabspaltung in Blutserum nicht finden. Über diese Versuche werde ich in der Münch. med. Wochenschr. demnächst berichten.

[3]) P. J. Hanzlic und R. J. Collins, Frank Hinman, Der Wert des Hexamethylentetramins als internes Antisepticum, Arch. of internal Medicine 13, 841, 1914; H. Vindevogel, nach Malys Jahresberichten 32, 124, 1902.

Neben dem Magensaft ist der Harn die einzige Körperflüssigkeit, die stärker saure Reaktion erreichen kann; nur in seltenen Fällen sinkt die Acidität bis zum neutralen Punkt, noch seltener wurde eine schwach alkalische Reaktion gefunden, wenn frische Harne, die der ammoniakalischen Zersetzung nicht unterlegen waren, verwendet wurden. Die Minimalwerte der H-Ionenkonzentrationen liegen etwa beim Blutwert. In folgender Tabelle gebe ich eine aus älteren und neueren Untersuchungen gewonnene Übersicht.

Beobachter	Maximalwert	Durchschnittswert	Minimalwert
v. Rhorer[1] . . .	p_H —	5,5	—
Höber[2]	p_H 5,0	5,3	6,3
Ringer[3]	p_H 4,96	5,56	6,99
Henderson[4] . .	p_H 5,5	6,2	7,5
Hanzlic und Collins[5]	p_H 4,5	6,4	7,4
Henderson und Palmer[6] . . .	p_H 4,8	6,0	7,5

Aus der Übersicht folgt, daß die H-Ionenkonzentration normaler Harne innerhalb sehr weiter Grenzen liegt: enthält doch ein dem maximalen Aciditätswert sich nähernder Harn über 100 mal so viel H-Ionen als ein neutraler oder schwach alkalischer Urin. Hieraus aber ergibt sich, daß die Geschwindigkeit, mit der Hexamethylentetramin im Harne zerlegt wird, außerordentlich verschieden sein muß. Nach Kurve 2 wird bei p_H 7,5 innerhalb 6 Stunden bei 38° höchstens 1%, bei p_H 5,0 in der gleichen Zeit dagegen rund 10% des zugegebenen Hexa-

---

[1]) L. v. Rhorer, Die Bestimmung der Harnacidität auf elektrometrischem Wege. Arch. f. d. ges. Physiol. **86**, 586, 1901.

[2]) R. Höber, Die Acidität des Harnes vom Standpunkte der Ionenlehre. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 525, 1903.

[3]) W. E. Ringer, Die Acidität des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 341, 1909.

[4]) Lawr. T. Henderson, Messungen der normalen Harnacidität, diese Zeitschr. **24**, 40, 1910.

[5]) P. J. Hanzlic und R. J. Collins, a. a. O.

[6]) Lawr. J. Henderson und W. W. Palmer, Über die Höhe der Harnacidität unter normalen und pathologischen Bedingungen. Journ. of biolog. Chem. **13**, 393, 1912.

methylentetramins gespalten. Die Aussichten, den Blaseninhalt antiseptisch zu beeinflussen, werden also sehr viel günstigere sein, wenn wir für eine ausreichende, möglichst für eine optimale Acidität des Urins Sorge tragen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Abhängigkeit der Hexamethylentetraminspaltung in Formaldehyd und Ammoniak von der Acidität der Lösung quantitativ verfolgt. Hohe Wasserstoffionenkonzentrationen begünstigen die Zerfallsgeschwindigkeit sehr stark, so daß in einer Lösung mit einer der $^n/_{10}$-HCl entsprechenden H-Ionenkonzentration bei 38° das gesamte Hexamethylentetramin in etwa 6 Stunden völlig abgebaut ist. Die Geschwindigkeit der Reaktion sinkt mit fallender H-Ionenkonzentration, doch nicht proportional dieser, sondern langsamer. Auch in neutraler Lösung, also bei gleichem Gehalt der Lösung an H- und OH-Ionen wird noch ein meßbarer Anteil des Hexamethylentetramins zerlegt (innerhalb 6 Stunden bei 38° etwas unter 1 °/₀). Der qualitative Nachweis fällt erst bei erheblich alkalischer Reaktion der Lösung negativ aus (bei 6 Stunden langer Einwirkung und 36° liegt die Grenze etwa bei $1 \cdot 10^{-9}$ g H-Ionen/L, eine solche Lösung wird durch Phenolphthalein stark gerötet).

Hieraus folgt, daß die Substanz im Magen zu einem sehr beträchtlichen Teil zerlegt wird. Eine wenn auch nur geringe Spaltung muß auch im Darminhalt, dem Blute und in den anderen Körperflüssigkeiten, wie Liquor cerebrospinalis, Humor aquaeus, Milch, vor sich gehen, da diese Flüssigkeiten schwächer alkalisch reagieren als der genannte Grenzwert (sie werden durch Phenolphthalein nicht gerötet!). Es bleibt aber eine offene Frage, ob sich Hexamethylentetramin in diesen Körperflüssigkeiten bei lebendem Organismus so stark anreichern läßt, daß in ihnen die baktericide Formaldehydgrenzkonzentration erzielt werden kann. Die Aussichten, durch Hexamethylentetramintherapie den Blaseninhalt zu sterilisieren, sind bei optimaler Harnacidität außerordentlich viel bessere als bei pessimaler Harnacidität (= neutraler oder ganz schwach alkalischer Reaktion). Denn die den Hexamethylentetraminzerfall ausdrückende Geschwindigkeitskonstante hat bei optimaler Harnacidität einen über 10 mal so hohen Wert als bei neutraler Reaktion.

Experimenteller Teil.

1. Zerlegung des Hexamethylentetramins in Puffergemischen fallender Acidität.

1. Reihe.

0,2 % Hexamethylentetramin in n/2-HCl + n/2-Glykokoll, 8 + 2

nach 10′	in 20,0 ccm =	6,3 mg NH_3;	32,4 %	des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 50′	„ 20,0 „ =	15,6 „ NH_3;	80,1 %	„ „ „
„ 70′	„ 15,0 „ =	12,7 „ NH_3;	86,9 %	„ „ „
„ 90′	„ 20,0 „ =	17,9 „ NH_3;	92,0 %	„ „ „
„ 120′	„ 20,0 „ =	18,8 „ NH_3;	96,8 %	„ „ „

2. Reihe.

0,2 % Hexamethylentetramin in n/2-HCl + n/2-Glykokoll, 7 + 3

nach 15′	in 15,0 ccm =	4,5 mg NH_3;	30,9 %	des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 55′	„ 15,0 „ =	9,7 „ NH_3;	66,7 %	„ „ „
„ 105′	„ 15,0 „ =	12,4 „ NH_3;	86,2 %	„ „ „
„ 155′	„ 15,0 „ =	13,7 „ NH_3;	93,6 %	„ „ „

3. Reihe.

0,2 % Hexamethylentetramin in n/2-HCl + n/2-Glykokoll, 6 + 4

nach 25′	in 20,0 ccm =	5,9 mg NH_3;	30,4 %	des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 75′	„ 15,0 „ =	8,7 „ NH_3;	59,5 %	„ „ „
„ 125′	„ 15,0 „ =	11,2 „ NH_3;	76,6 %	„ „ „
„ 177′	„ 15,0 „ =	12,9 „ NH_3;	88,2 %	„ „ „
„ 295′	„ 15,0 „ =	14,1 „ NH_3;	96,5 %	„ „ „
„ 360′	„ 15,0 „ =	14,3 „ NH_3;	98,3 %	„ „ „

4. Reihe.

0,2 % Hexamethylentetramin in n/2-HCl + n/2-Glykokoll, 5 + 5

nach 20′	in 20,0 ccm =	2,7 mg NH_3;	13,6 %	des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 65′	„ 20,0 „ =	6,6 „ NH_3;	33,8 %	„ „ „
„ 120′	„ 20,0 „ =	9,6 „ NH_3;	49,1 %	„ „ „
„ 190′	„ 15,0 „ =	9,2 „ NH_3;	63,2 %	„ „ „
„ 250′	„ 15,0 „ =	10,4 „ NH_3;	71,4 °/°	„ „ „
„ 305′	„ 15,0 „ =	11,4 „ NH_3;	77,8 %	„ „ „
„ 360′	„ 15,0 „ =	12,3 „ NH_3;	84,2 %	„ „ „

5. Reihe.

0,2 % Hexamethylentetramin in n/2-HCl + n/2-Glykokoll, 3 + 7

nach 30′	in 25,0 ccm =	2,2 mg NH_3;	9,3 %	des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 90′	„ 25,0 „ =	5,1 „ NH_3;	21,0 %	„ „ „
„ 165′	„ 20,0 „ =	6,8 „ NH_3;	35,1 %	„ „ „
„ 230′	„ 25,0 „ =	10,0 „ NH_3;	41,1 %	„ „ „
„ 360′	„ 20,0 „ =	10,2 „ NH_3;	52,6 %	„ „ „

6. Reihe.

1 $^0/_0$ Hexamethylentetramin in n-Essigsäure

nach 15′ in 25,0 ccm = 7,8 mg NH_3; 3,1 $^0/_0$ des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 30′ „ 20,0 „ = 4,5 „ NH_3; 4,7 $^0/_0$ „ „ „
„ 60′ „ 25,0 „ = 8,5 „ NH_3; 7,0 $^0/_0$ „ „ „
„ 120′ „ 20,0 „ = 10,9 „ NH_3; 11,2 $^0/_0$ „ „ „
„ 135′ „ 20,0 „ = 11,4 „ NH_3; 11,7 $^0/_0$ „ „ „
„ 180′ „ 20,0 „ = 13,7 „ NH_3; 14,0 $^0/_0$ „ „ „
„ 310′ „ 20,0 „ = 18,6 „ NH_3; 19,1 $^0/_0$ „ „ „
„ 360′ „ 20,0 „ = 20,5 „ NH_3; 21,1 $^0/_0$ „ „ „

7. Reihe.

1 $^0/_0$ Hexamethylentetramin in $^n/_{2,5}$-Essigsäure + $^n/_{2,5}$-Natriumacetat, 1 + 1

nach 37′ in 25,0 ccm = 2,7 mg NH_3; 2,2 $^0/_0$ des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 60′ „ 20,0 „ = 2,9 „ NH_3; 3,0 $^0/_0$ „ „ „
„ 95′ „ 25,0 „ = 4,2 „ NH_3; 3,4 $^0/_0$ „ „ „
„ 140′ „ 20,0 „ = 4,3 „ NH_3; 4,5 $^0/_0$ „ „ „
„ 300′ „ 20,0 „ = 6,4 „ NH_3; 6,7 $^0/_0$ „ „ „
„ 360′ „ 20,0 „ = 7,8 „ NH_3; 8,1 $^0/_0$ „ „ „

8. Reihe.

1 $^0/_0$ Hexamethylentetramin in $^n/_5$ prim. + $^n/_5$ sek. Natriumphosphat, 8 + 2

nach 60′ in 20,0 ccm = 0,7 mg NH_3; 0,7 $^0/_0$ des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 135′ „ 20,0 „ = 1,1 „ NH_3; 1,1 $^0/_0$ „ „ „
„ 320′ „ 20,0 „ = 1,4 „ NH_3; 1,5 $^0/_0$ „ „ „
„ 360′ „ 20,0 „ = 1,4 „ NH_3; 1,5 $^0/_0$ „ „ „

9. Reihe.

1 $^0/_0$ Hexamethylentetramin in $^n/_5$ prim. + $^n/_5$ sek. Natriumphosphat, 1 + 1

nach 60′ in 20,0 ccm = 0,3 mg NH_3; 0,3 $^0/_0$ des Hexamethylentetramins zerlegt
„ 135′ „ 20,0 „ = 0,5 „ NH_3; 0,5 $^0/_0$ „ „ „
„ 190′ „ 20,0 „ = 0,6 „ NH_3; 0,6 $^0/_0$ „ „ „
„ 300′ „ 20,0 „ = 0,9 „ NH_3; 0,9 $^0/_0$ „ „ „
„ 360′ „ 20,0 „ = 0,9 „ NH_3; 0,9 $^0/_0$ „ „ „

10. Reihe.

1 $^0/_0$ Hexamethylentetramin gab mit 1 $^0/_0$ Phloroglucin, in 33 $^0/_0$ Natronlauge gelöst, folgende Formaldehydreaktion (Rotfärbung):

Hexamethylentetramin gelöst in:	nach 60′	nach 360′
a) 5,5 $^n/_{10}$-NaH_2BO_4 + 4,5 $^n/_{10}$-HCl	++	+++
b) 5,75 $^n/_{10}$-NaH_2BO_4 + 4,25 $^n/_{10}$-HCl	++	+++
c) 7,0 $^n/_{10}$-NaH_2BO_4 + 3,0 $^n/_{10}$-HCl	+	++
d) 7,5 $^n/_{10}$-NaH_2BO_4 + 2,5 $^n/_{10}$-HCl	+	+
e) 8,0 $^n/_{10}$-NaH_2BO_4 + 2,0 $^n/_{10}$-HCl	0	+
f) 9,0 $^n/_{10}$-NaH_2BO_4 + 1,0 $^n/_{10}$-HCl	0	0

2. Colorimetrische Bestimmung der H-Ionenexponenten nach Sörensen.

		Im Beginn	Nach 360′	Indicator	
Reihe	1	0,5	0,6	Methylviolett	
„	2	0,7	0,8	„	
„	3	1,0	1,1	„	
„	4	1,7	1,7	„	
„	5	2,6	2,6	„	
„	6	3,9	4,0	Methylorange, Lackmus	
„	7	5,2	5,2	Alizarinsulfosaures Natrium	
„	8	6,3	6,3	Neutralrot, Rosolsäure	
„	9	6,75	6,75	„ „	
„	10 a)	8,2	8,2	α-Naphtholphthalein	
„	10 b)	8,4	8,4	„	Phenolphthalein
„	10 c)	8,75	8,75	„	„
„	10 d)	8,9	8,9	„	„
„	10 e)	9,0	9,0	„	„
„	10 f)	9,1	9,1	„	„

3. Kontrollversuche.

	Gehalt der in die siedende NaOH getropften Lösung an		Gefunden im Destillat	
	N als NH_4Cl	Formaldehyd	N	
	mg	g	mg	= %
1.	6,6	0,066	6,65	100,9
2.	6,6	0,156	6,65	100,9
3.	6,6	0,660	6,59	99,8
4.	13,5	0,030	13,7	101,5
5.	13,5	0,060	13,7	101,5
6.	13,5	0,100	13,3	98,5
7.	13,5	0,300	13,4	99,3

4. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten

$$\left(k = \frac{1}{t} \ln \frac{c}{c - x}\right).$$

t = Zeit nach Versuchsbeginn. x = umgesetzte Menge. c = Anfangskonzentration.

1. Reihe.			2. Reihe.		
$t = 10'$	$c - x = 65$	$k = 0{,}043$	$t = 20'$	$c - x = 61{,}5$	$k = 0{,}024$
$t = 20'$	$c - x = 46$	$k = 0{,}039$	$t = 40'$	$c - x = 41{,}5$	$k = 0{,}022$
$t = 30'$	$c - x = 34$	$k = 0{,}035$	$t = 60'$	$c - x = 30$	$k = 0{,}020$
$t = 40'$	$c - x = 25$	$k = 0{,}035$	$t = 80'$	$c - x = 22$	$k = 0{,}019$
$t = 60'$	$c - x = 16{,}5$	$k = 0{,}030$	$t = 100'$	$c - x = 16$	$k = 0{,}018$
$t = 80'$	$c - x = 10$	$k = 0{,}029$	$t = 120'$	$c - x = 11{,}5$	$k = 0{,}017$

3. Reihe.

$t = 20'$	$c - x = 73$	$k = 0,016$
$t = 40'$	$c - x = 57,5$	$k = 0,014$
$t = 60'$	$c - x = 47$	$k = 0,012$
$t = 80'$	$c - x = 38,5$	$k = 0,012$
$t = 100'$	$c - x = 31$	$k = 0,012$
$t = 150'$	$c - x = 17,5$	$k = 0,012$
$t = 200'$	$c - x = 10$	$k = 0,012$

4. Reihe.

$t = 20'$	$c - x = 86,5$	$k = 0,0073$
$t = 40'$	$c - x = 77$	$k = 0,0068$
$t = 60'$	$c - x = 68,5$	$k = 0,0063$
$t = 100'$	$c - x = 56$	$k = 0,0058$
$t = 150'$	$c - x = 44,5$	$k = 0,0054$
$t = 200'$	$c - x = 35,5$	$k = 0,0052$
$t = 250'$	$c - x = 28,5$	$k = 0,0050$
$t = 300'$	$c - x = 22$	$k = 0,0050$
$t = 350'$	$c - x = 18$	$k = 0,0049$

5. Reihe.

$t = 40'$	$c - x = 88$	$k = 0,0032$
$t = 80'$	$c - x = 79,5$	$k = 0,0029$
$t = 100'$	$c - x = 76$	$k = 0,0027$
$t = 150'$	$c - x = 67,5$	$k = 0,0021$
$t = 200'$	$c - x = 61,5$	$k = 0,0025$
$t = 250'$	$c - x = 56,5$	$k = 0,0023$
$t = 300'$	$c - x = 52$	$k = 0,0026$
$t = 350'$	$c - x = 48,5$	$k = 0,0021$

6. Reihe.

$t = 50'$	$c - x = 93,5$	$k = 0,0013$
$t = 100'$	$c - x = 90$	$k = 0,0011$
$t = 150'$	$c - x = 87,5$	$k = 0,00089$
$t = 200'$	$c - x = 85$	$k = 0,00081$
$t = 250'$	$c - x = 83$	$k = 0,00075$
$t = 300'$	$c - x = 81$	$k = 0,00070$
$t = 350'$	$c - x = 79,5$	$k = 0,00066$

7. Reihe.

$t = 60'$	$c - x = 97,8$	$k = 0,00037$
$t = 140'$	$c - x = 95,5$	$k = 0,00016$
$t = 360'$	$c - x = 91,9$	$k = 0,00024$

8. Reihe.

$t = 60'$	$c - x = 99,3$	$k = 0,00012$
$t = 135'$	$c - x = 98,9$	$k = 0,000082$
$t = 360'$	$c - x = 98,5$	$k = 0,000042$

9. Reihe.

$t = 60'$	$c - x = 99,7$	$k = 0,000050$
$t = 190'$	$c - x = 99,4$	$k = 0,000031$
$t = 360'$	$c - x = 99,1$	$k = 0,000025$

Über die Alkaloide bei Verwundungen der Pflanzen.

Von

O. Tunmann.

(Eingegangen am 13. April 1919.)

Wir sind über die Frage, wie sich die Alkaloide bei Verwundungen von Pflanzen verhalten, nur recht mangelhaft unterrichtet. Es ist nicht sicher festgestellt, ob die Verwundung eine Vermehrung oder Verminderung der Alkaloidbildung zur Folge hat. Meines Wissens hat nur Troegele[1]) die Frage näher verfolgt und unter Hinweis auf die Cinchonen eine Vermehrung der Alkaloide bei Verwundungen angenommen. „Ein Beispiel dafür, daß im Anschluß von Verwundung eine reichlichere Alkaloidbildung stattfindet, sind die Cinchonen, bei denen nach Entfernung der Rinde ein hoher Alkaloidgehalt in der sich neu bildenden Rinde beobachtet werden kann." Des weiteren hat Troegele eigene Versuche an Atropa Belladonna angestellt. Er schnitt aus dem Stengel 5 ccm lange, bis ins Mark gehende Stücke heraus und fand: „eine außerordentliche starke Anhäufung von Alkaloiden an der verletzten Stelle, und zwar in allen histologischen Elementen; aber auch die der Wundfläche naheliegenden Gewebepartien zeigen diese Überschwemmung mit Alkaloiden." Vermutlich seien die Alkaloide nach der Wundfläche geleitet worden, da nach früheren Untersuchungen die Wanderung der Alkaloide in der Achse erwiesen sei. — Wie man sieht, ist die ganze Frage so gut wie ungeklärt.

Zunächst möchte ich drei verschiedene Fälle auseinander-

[1]) F. Troegele, Über das Verhalten der Alkaloide in den Organen der Atropa Belladonna L., Würzburger Dissertation 1900, S. 82ff.

halten: I. der Wundreiz kann eine Änderung im histologischen Aufbau zur Folge haben, wodurch eine Änderung im Alkaloidgehalt bedingt wird. II. Selbstverständlich werden bei Verwundungen die Alkaloide sich aus den angeschnittenen Zellen an der Wundfläche anhäufen. An dieser Anhäufung können sich die Alkaloide der benachbarten Gewebe beteiligen (Änderung der osmotischen Verhältnisse). III. Der Wundreiz könnte direkt eine Alkaloidvermehrung zur Folge haben, die gleichzeitig mit dem Prozeß der Wundvernarbung stattfindet.

Naturgemäß sind hier die milchsaftführenden Alkaloidpflanzen auszuscheiden. Ganz allgemein ist es nicht angängig, die bei jenen Pflanzen gemachten Befunde auf die übrigen Alkaloidpflanzen zu übertragen, wie es in neuester Zeit vielfach geschieht.

Gehen wir nun auf die oben genannten drei Fälle näher ein. I. Die Annahme Troegeles, daß der Wundreiz bei den Cinchonen eine reichlichere Alkaloidbildung bedingt, trifft nicht zu. Der höhere Alkaloidgehalt der sogenannten renewed bark ist auf die reichliche Bildung parenchymatischer Elemente zurückzuführen [Tschirch[1])]. Nur die Parenchymzellen führen Alkaloide, wie zuerst einwandfrei makrochemisch von Carl Müller (Heidelberg 1869), mikrochemisch von Parfenow (Dorpat 1885) gezeigt wurde. Die Bastfasern sind alkaloidfrei. Auch bei der Yohimbe-Rinde erhält man im Wundparenchym besonders scharfe Alkaloidreaktionen. „Ebenso wie bei den Cinchonen fehlen bei Coryanthe im Wundparenchym die alkaloidfreien Bastfasern, die natürlich den Gesamtgehalt der Rinde herabsetzen“ [Tunmann[2])]. Somit steht bei diesen Pflanzen die Alkaloidvermehrung nur indirekt mit dem Wundreiz in Verbindung. Durch die Verwundung erfolgt nur eine vermehrte Bildung von Parenchym.

II. Troegele schnitt aus der Achse von Atropa Belladonna 6 cm lange, bis ins Mark reichende Stücke heraus. Da mir die Pflanzen bei diesen Verwundungen erkrankten, stach ich mit einem scharfen Korkbohrer 3 bis 4 mm breite Stücke

---

[1]) Tschirch in Tschirch-Oesterle, Anatomischer Atlas, S. 35.

[2]) Tunmann, Über angewandte Pflanzen-Mikrochemie, Naturforscher-Vers., Karlsruhe 1911.

heraus und stützte auf beiden Seiten die Pflanzen durch schmale Schienen. Nach etwa vier Wochen wurden die durch verkorktes Parenchym abgeschlossenen Wunden untersucht. Mikrochemisch konnte eine Alkaloidvermehrung nicht wahrgenommen werden, insbesondere war eine „Überschwemmung der Wundstelle mit Alkaloiden" bei den angestellten vier Versuchen ausgeschlossen. Troegele zieht zur Erklärung seines Befundes die Wanderung der Alkaloide in der Achse heran. Aber diese erfolgt, soweit wir es derzeit beurteilen können, ungemein langsam. Normalerweise alkaloidfreie Zellen waren nach der Vernarbung noch alkaloidfrei. Man kann bis jetzt nur sagen, daß bei Verwundungen sich lediglich jene Alkaloide anhäufen, die in den angeschnittenen Zellen und in den diesen benachbarten Zellen enthalten waren.

III. Es ist von vornherein wenig wahrscheinlich, daß der Wundreiz eine Alkaloidvermehrung bedingt. Die Alkaloide kommen als Bausteine bei der Wundheilung nicht in Betracht. Hierzu dienen in erster Linie Polysaccharide und Fettsäuren (zur Membranbildung, zur Kutinisierung und Verkorkung). Bei Pflanzen mit Glucotannoiden erfolgt an der Wundstelle eine Spaltung dieser Körper, die gerbstoffartigen Spaltlinge gehen durch Oxydation in Phlobaphene über und durchtränken die Membranen. Die Alkaloide verkleben auch nicht die Wunde wie Harz oder Milchsaft.

Um künstliche Eingriffe auszuschalten, wurden die durch Erdflöhe und Schnecken heimgesuchten Blätter von Atropa Belladonna untersucht.

Die von den Larven der Erdflöhe angefressenen Blätter sind bekanntlich stark „durchlöchert". Der die Löcher umgebende Hof erscheint hellgelb und ist chlorophyllfrei. Mikrochemisch gibt dieser Hof keine Alkaloidreaktion. Es muß angenommen werden, daß die vorhandenen Alkaloide zersetzt sind und neue Alkaloide nicht mehr gebildet wurden. Es wurden einige quantitative Bestimmungen an gleich großen Blättern ausgeführt, und zwar wurden die ausgezogenen Alkaloide mit Kieselwolframsäure gefällt (Näheres über das Verfahren ist in der Dissertation des Herrn Ed. Baur, Bern 1919, zu ersehen).

	Frühjahr %	Juni %	Ende Juli %
Angefressene Blätter .	0,044	0,039	0,023
Ganze Blätter . . .	0,041	0,043	0,030

Zu diesen Werten ist zu bemerken, daß im Belladonnablatt die Hauptmenge der Alkaloide in den Nerven auftritt, und daß andererseits die Erdflöhe nur die Lamina anfressen.

Des weiteren wurde der Alkaloidgehalt von Gehäuseschnecken angefressener Blätter, sowie der Gehalt gleich großer und zu gleicher Zeit geernteter ganzer Blätter bestimmt.

Angefressene Blätter . 0,049% (auf Frischgewicht bezogen)
Ganze Blätter . . . 0,037% („ „ „)

Der höhere Gehalt der angefressenen Blätter ist hier ebenfalls auf die Tatsache zurückzuführen, daß die Schnecken vorzugsweise die alkaloidarme Lamina fressen. Nun wurde der Versuch wiederholt, aber nur die bis zur Mittelrippe abgetrennten Blatthälften in Untersuchung genommen.

	I %	II %	
Angefressene Blatthälften	0,027	0,022	(auf Frischgewicht bezogen)
Ganze Blatthälften . . .	0,026	0,022	(„ „ „)

Bei den bisher angeführten Versuchen stammte das Material von im Freien wachsenden Sträuchern her.

Zu der folgenden Bestimmung (ausgeführt nach dem Deutschen Arzneibuch) benutzte ich frische am Zweige befindliche Belladonnablätter. Die Gehäuseschnecken (Helix-Arten) nehmen auch nach längerer Hungerzeit die Blätter niemals an, selbst nicht die frisch gepflückten. Erst wenn die Blätter kräftig benetzt sind, werden sie gierig verzehrt[1]). Die Schnecken wurden

[1]) Man nimmt allgemein an, daß die Schnecken unempfindlich für bestimmte Alkaloidpflanzen sind (Spezialisten im Sinne von E. Stahl). Nach meinen Erfahrungen fallen noch weitere Punkte wesentlich in Betracht. Es ist mit Sicherheit festgestellt, daß der Alkaloidgehalt in der Lamina der Blätter von Atropa nach längerer Regenzeit ein bedeutend geringerer ist als bei schönem Wetter. Nach Regenwetter finden sich die Alkaloide vorzugsweise in den Hauptnerven. Die Schnecken fressen aber nur gut benetzte Blätter, also nur Blätter nach dem Regen, d. h. alkaloidarme. Die stärkeren Nerven werden weniger verzehrt und überdies in unverdautem Zustande ausgestoßen. Nur die

nun nur auf den einen (angefeuchteten) Blatthälften zum Fraße zugelassen, und zwar so lange, bis annähernd ein Drittel der Blattfläche verzehrt war. Alsdann wurde der Zweig auf zwei Tage ins Wasser gestellt. Schließlich wurden die Blatthälften scharf am Hauptnerv abgetrennt und quantitativ untersucht.

		%	
Ganze Blatthälften . . .	(im Mittel)	0,032	(auf Frischgewicht)
Angefressene Blatthälften	(„ „)	0,029	(„ „)

Sämtliche Bestimmungen stimmen mit den mikrochemischen Befunden überein und zeigen, daß der Wundreiz auf die Alkaloidbildung keinen Einfluß ausübt und daß an den Wundrändern keine Anhäufung der Alkaloide stattfindet. —

Die an Atropa Belladonna erzielten Ergebnisse wurden an Pilocarpus pennatifolius Lem. ergänzt. Die Versuchspflanze war eine neunjährige kräftige Topfpflanze. In gleich langen Blättern wurden an den einen Blatthälften mit einem Korkbohrer Blattstückchen herausgehoben. Die Blätter verblieben darauf noch zwei Wochen an der Pflanze. Einige Blätter zeigten um die Wunde größere etiolierte Zonen. Die meisten Blätter blieben völlig grün, die Wunden waren vernarbt, überwiegend mit harzigem Sekret (aus den schizolysigenen Drüsen) verschmiert. In den Wundrändern waren Alkaloidreaktionen zweifelhaft. Nach zwei Wochen wurden die Blätter abgenommen, die Blatthälften an der Mittelrippe abgeschnitten und sofort untersucht. Bestimmung nach Keller-Fromme:

Lamina fällt der Verdauung anheim. In den ausgestoßenen Nervenstückchen habe ich stets schärfere Alkaloidreaktionen erhalten als in den Exkrementen. Zuweilen gelang der Alkaloidnachweis in den Exkrementen nicht. — Hasen und Kaninchen sollen nach Angaben der Literatur bei ausschließlicher Fütterung mit Atropa Belladonna gut gedeihen. Nur Peyer (Biolog. Studien über Schutzstoffe, Jenaer Dissert. 1911) fand, daß diese Tiere Atropablätter niemals annahmen. Bei unseren Versuchen fraßen stark hungernde Kaninchen zunächst die Blätter, nahmen sie aber bei der zweiten Fütterung nur wenig und mit sichtbarem Widerwillen an. In den Exkrementen gelang der Nachweis der Alkaloide nicht. Dieser Befund scheint mir die Angaben von J. Clark zu bestätigen (Brit. med. Journ. 26. X. 1912), nach denen die Kaninchen in der Leber Enzyme enthalten, die Atropin zersetzen.

	Trocken-substanz	Alkaloid g	Alkaloid %
10 Blatthälften, 11 cm lang . .	6,34	0,058 =	0,91
Die zugehörigen, ausgestochenen 10 Blatthälften	4,58	0,041 =	0,89

Die herausgestoßene Blattmasse war für eine quantitative Bestimmung zu gering.

Somit stimmt Pilocarpus pennatifolius Lem. mit Atropa Belladonna L. überein. Eine Anhäufung der Alkaloide findet bei auf künstlichem oder natürlichem Wege entstandenen Blattwunden nicht statt. Bei den Achsen sammeln sich an den Rändern der Wunde nur die Alkaloide der angeschnittenen Zellen und der diesen benachbarten Zellen an. Der Wundreiz übt auf die Alkaloidbildung keinen Einfluß aus.

Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen

III. Mitteilung.

Von

Friedrich Boas und Hans Leberle.

(Aus dem botanischen und dem chemisch-technischen Laboratorium der Akademie Weihenstephan.)

(Eingegangen am 14. April 1919.)

Mit 3 Kurventafeln im Text[1]).

In der vorliegenden Arbeit kommen Versuche zur Darstellung, in denen unser Versuchspilz Aspergillus niger zur Deckung seines Stickstoffbedürfnisses bei seinem Eiweißaufbau stets 2 Stickstoffverbindungen zur Verfügung hatte. Die eine dieser Stickstoffverbindungen war bei allen Versuchen Ammonsulfat; die andere Asparagin oder Acetamid, oder eine Aminosäure, wie Glykokoll. Es hat der Pilz demnach die Wahl zwischen dem Verbrauch von Ammonsulfat, wobei sich stets freie Schwefelsäure bildet und alle Folgen der Wirkung starker Säuren sich bemerkbar machen, und dem Verbrauch der erwähnten organischen Stickstoffverbindungen, bei deren Verarbeitung keine starken Säuren oder sonstige schädliche Stoffwechselverbindungen auftreten. Es handelt sich also bei unserer Versuchsanordnung, wo infolge der Zusammensetzung der Nährlösung eine Neutralisation der gebildeten Säure unmöglich war, um die Wahl zwischen den schädlich werdenden anorganischen und den unschädlichen organischen Stickstoffverbindungen. Die folgenden Untersuchungen bringen daher

---

[1]) Siehe diese Zeitschr. 90, 78ff., 1918 und 92, 171ff., 1918.

einen Beitrag zur Lehre von dem elektiven Stickstoffwechsel, was insofern wichtig ist, als eingehende Versuche in dieser Richtung, abgesehen von den Arbeiten Zaleskis[1]), noch nicht vorliegen. Zwar ist allgemein bekannt, daß z. B. Ammonsalze durchwegs den Nitraten vorgezogen werden, doch fehlt es hier noch sehr an genaueren Arbeiten. Die vorliegenden Darstellungen sind auch insofern von Interesse, als sie quantitative Untersuchungen allerdings nur der Werte der aktuellen Säure bringen, woran es bis jetzt gefehlt hat; jedenfalls können unsere Messungen als quantitativ angesehen werden, wenn auch in einzelnen Fällen vielleicht eine eingehendere chemische Analyse noch erwünscht gewesen wäre. Es sind in der vorliegenden Arbeit neben den Zahlen der Wasserstoffionenkonzentration noch alle irgendwie nötigen Angaben, wie Erntegewicht, Auftreten von Ammoniak in der Nährlösung, Ausbildung der Konidien vorhanden, um in allen Fällen ein klares Bild zu erlangen, da z. B. die p_H-Werte an sich gar nichts aussagen, wenn nicht auch die morphologischen Angaben als Vergleichswerte der Wachstumsintensität vorhanden sind. Ohne die gleichzeitige Verwertung aller Angaben müssen eben die Ergebnisse immer unbestimmt und ungenügend für weitere Schlüsse bleiben.

Die Nährlösung war wie bei unseren früheren Versuchen[2]) zusammengesetzt, ebenso waren die Kulturbedingungen dieselben. In Versuch 41 wurde ausschließlich Acetamid, in Versuch 25 nur Ammonsulfat verwendet. In Versuch 42 wurde eine Mischung dieser beiden Stickstoffquellen angewandt. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle betrug 5 $^0/_0$ Dextrose. In Versuch 41 und 25 wurde je 0,5 $^0/_0$ Stickstoffquelle gegeben, in Versuch 42 je 0,25 $^0/_0$ Acetamid und Ammonsulfat verwendet.

Acetamid ist als Säureamid eine ziemlich schlechte Stickstoffquelle[3]), ist aber im Gegensatz zu Ammonsulfat ziemlich lipoidlöslich, es besteht also, falls die Lipoidlöslichkeit den Verbrauch reguliert, die Möglichkeit, daß Acetamid in Stickstoff-

---

[1]) W. Zaleski und W. Israilsky, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 32, 472 bis 479, 1914; ferner W. Zaleski und D. Pjukow, ebenda 479 bis 483, 1914.

[2]) F. Boas und Hans Leberle, diese Zeitschr. 90, 78 ff. und 92, 170 ff., 1918.

[3]) Vergl. hierzu die Arbeiten von Czapek, Lutz, Boas.

gemischen dem Ammonsulfat vorgezogen wird. Bei Verarbeitung des Ammonsulfates kommen bekanntlich alle Einflüsse der frei werdenden starken Schwefelsäure zur Geltung, nämlich Unterdrückung der im normalen Stoffwechsel auftretenden Oxalsäure, Bildung löslicher Stärke und Verzögerung der Konidienbildung. Es handelt sich also um tief in den Stoffwechsel einschneidende Störungen. Theoretisch bzw. teleologisch könnte also im vorliegenden Fall sehr wohl das harmlose Acetamid dem schädlich wirkenden Ammonsulfat vorgezogen werden. In Wirklichkeit wird Ammonsulfat verarbeitet und Acetamid quantitativ unberührt gelassen, wie die folgenden p_H-Werte zeigen:

	Versuch 41	42	48	25
	Dextrose-Acetamid (0,5 %)	Dextrose-Acetamid-Ammonsulfat (je 0,25 %)	Dextrose-Ammonsulfat (0,25 %)	Dextrose-Ammonsulfat (0,5 %)
Kontrolle p_H	4,86	4,38	4,68	4,12
2. Tag	3,76	2,47	1,89	1,84
3. „	3,49	1,91	1,70	1,68
4. „	3,40	1,67	1,70	—
5. „	3,17	1,74	1,84	—
6. „	—	—	—	1,93
7. „	—	2,55	—	—

Wie die Säurewerte zeigen, stimmen die Maximalzahlen der in Betracht kommenden Versuche so vollkommen überein (p_H 1,67 Versuch 42, p_H 1,70 Versuch 48 und p_H 1,68 Versuch 25), daß der Schluß als einwandfrei erscheint, daß Acetamid neben Ammonsulfat vollkommen unberührt bleibt. Die Lipoidlöslichkeit des Acetamides ist demnach als bedeutungslos für die Möglichkeit seines Verbrauches zu betrachten.

Wir lassen auch noch die Erntegewichtszahlen, die ganz in dem vorgetragenen Sinne sprechen, hier folgen:

	Versuch 41	42	48
	Dextrose-Acetamid	Dextrose-Acetamid-Ammonsulfat	Dextrose-Ammonsulfat
2. Tag	0,008 g sofort viele Konidien	0,287 g weiße Decke	—

	Versuch 41 Dextrose-Acetamid	42 Dextrose Acetamid-Ammonsulfat	48 Dextrose-Ammonsulfat
3. Tag	0,0095 g	0,729 g	0,832 g weiße Decke
4. "	0,0145 "	1,115 "	0,852 g
5. "	0,0240 "	1,089 " wenig Konidien	—
7. "	—	0,935 g	—

Das Vorhandensein von Oxalsäure in der Nährlösung zeigt folgende Übersicht:

	Versuch 41	42	48
2. Tag	—	—	—
3. "	(+) Spur	—	—
4. "	+ deutlich	—	—

Statt der Oxalsäure findet sich als Schwefelsäurewirkung in Versuch 42 (48 als Vergleich) lösliche Stärke in der Nährlösung, wie die folgende Übersicht zeigt. Lösliche Stärke in der Nährlösung am:

	Versuch 41		42	48
2. Tag	—	(keine lösliche Stärke,	—	—
3. "	—	weil mit der entstehenden Oxalsäure eine zu	—	—
4. "	—	geringe Menge [H·] er-	+	+
5. "	—	zielt wird)	+	(+) Spur

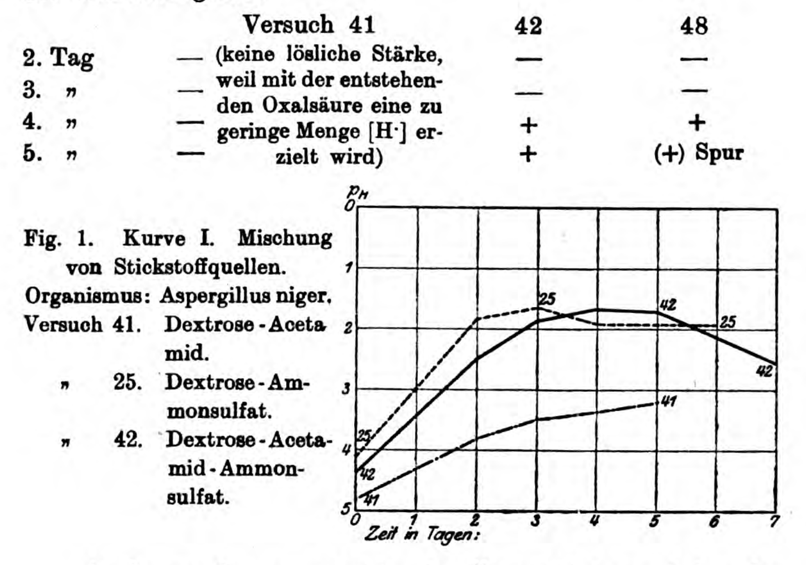


Fig. 1. Kurve I. Mischung von Stickstoffquellen. Organismus: Aspergillus niger. Versuch 41. Dextrose-Acetamid. " 25. Dextrose-Ammonsulfat. " 42. Dextrose-Acetamid-Ammonsulfat.

Auch aus dieser vergleichenden Übersicht kann daher der berechtigte Schluß gezogen werden, daß bei gleichzeitigem Vorhandensein von Acetamid und Ammonsulfat nur letzteres verbraucht wird, Acetamid aber nicht in den Stoffwechsel für den Eiweißaufbau gezogen wird.

Die p_H - Werte dieser Versuchsreihen sind in Kurve I zusammengestellt. Diese Kurve macht im Verein mit den vorstehenden Angaben eine weitere Erörterung unnötig.

II.

Wenn wir statt der Kombination Säureamid-Ammonsulfat die Kombination Amid-Aminosäure wählen, so erhalten wir insofern ganz genau die gleichen Verhältnisse, als nämlich die lipoidunlösliche Aminosäure dem lipoidlöslichen Amid fast quantitativ vorgezogen wird. Als Amid wurde wieder Acetamid und als Aminosäure Glykokoll gewählt. Säurewirkungen durch stoffwechselfremde Säuren bleiben hier aus, denn in beiden Fällen entsteht das normale Stoffwechselprodukt des Aspergillus niger, die Oxalsäure. Wie die Kurve II zeigt, beeinflußt Acetamid den Verlauf der Säurebildung kaum. Charakteristisch ist für Glykokoll allein, wie für die Mischung Acetamid-Glykokoll der starke Abfall der Kurve; dieser Abfall fällt in der Hauptsache mit dem Auftreten von viel Ammoniak in der Nährlösung zusammen als Folge von Desamidierung von Glykokoll und der durch Selbstverdauung (Proteolyse des Pilzes) auftretenden großen Mengen von Ammoniak und alkalisch reagierenden Verbindungen. Dagegen tritt in der Acetamidlösung Ammoniak erst nach langer Versuchsdauer auf. Die Erntegewichte, ebenso das Auftreten von Konidien, stimmen bei Glykokoll (45) und Glykokoll-Acetamid (43) so genau überein, daß der Schluß gerechtfertigt ist, daß **Acetamid jedenfalls nur in Spuren verarbeitet werden kann.** Die sämtlichen hierher gehörenden Angaben sind in der folgenden Übersicht vereinigt.

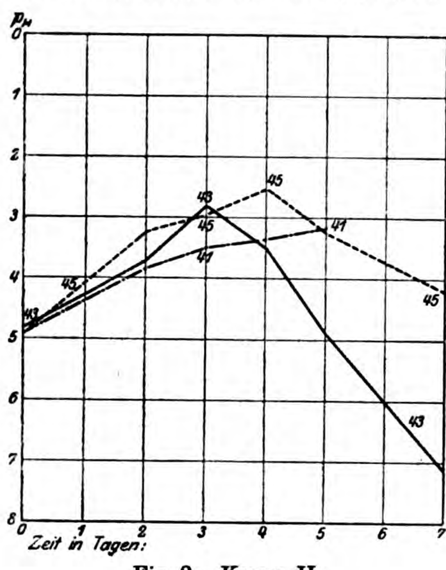


Fig. 2. Kurve II.

Legende zu Kurve II. Versuch 41, 45, 43.

	Versuch 41	45	43
	Dextrose-Acetamid (0,5 %)	Dextrose-Glykokoll (0,5 %)	Dextrose-Glykokoll-Acetamid (je 0,25 %)
1. Erntegewichte.			
am 2. Tag	0,008 g	0,3585 g	0,321 g
" 3. "	0,0095 "	0,6645 "	1,0085 "
" 4. "	0,0145 "	0,9030 "	1,253 "
" 5. "	0,0240 "	0,9240 "	1,070 "
	—	—	0,714 "
2. Neßlerreaktion.			
am 2. Tag	—	—	—
" 3. "	—	+	gelb
" 4. "	—	+	stark +
" 5. "	—	++	" +
" 7. "	—	++	" ++
3. Konidienbildung.			
am 2. Tag	Viele Konidien	Schneeweiße Decke	Weiße Decke
" 3. "	do.	do.	Wenig Konidien
" 4. "	Schwarze Pilzdecke	Wenig Konidien	" "
" 5. "	do.	Viele "	Viele "
4. Werte der aktuellen Säure.			
p_H Kontrolle	4,86	4,88	4,77
am 2. Tag	3,76	3,26	3,75
" 3. "	3,49	2,77	2,81
" 4. "	3,40	2,53	3,48
" 5. "	3,17	3,26	4,86
" 7. "	—	4,19	7,12

III.

Als dritten Versuch für die Auswahl der Stickstoffquelle durch den Pilz wählten wir ein hochmolekulares Eiweiß, Pepton in der Mischung mit Ammonsulfat.

Auch in dieser Mischung wird wie in den Versuchen 41 bis 42 (Acetamid-Ammonsulfat) quantitativ das Ammonsulfat verbraucht, obwohl Pepton eine sehr gute Stickstoffquelle ist.

In Versuch 46 wird als Stickstoffquelle Pepton verwendet, während der zum Vergleiche mit angeführte Versuch 25 Ammonsulfat enthält. In Versuch 47 ist wieder durch Mischung gleicher

Teile der beiden Stickstoffquellen von 46 und 25 die Konzentration der Stickstoffquelle je 0,25 %.

Die p_H-Werte kommen in der Kurve III zur Darstellung, während die übrigen zum Verständnis nötigen Zahlen wie die Angaben über Erntegewichte, Ammoniakreaktion und Konidienbildung in der folgenden Tabelle niedergelegt sind.

	Versuch 46 Dextrose-Pepton (0,5 %)	Versuch 47 Dextrose-Pepton-Ammonsulfat (je 0,25 %)	Versuch 25 Dextrose-Ammonsulfat (0,5 %)
Ausgangs-p_H	5,65	5,53	4,12
nach 2 Tagen	3,09	2,36	1,84
„ 3 „	2,62	1,87	1,68
„ 4 „	2,29	1,91	1,91
„ 5 „	2,11	1,94	—
„ 6 „	—	—	1,93
„ 7 „	2,45	1,94	—

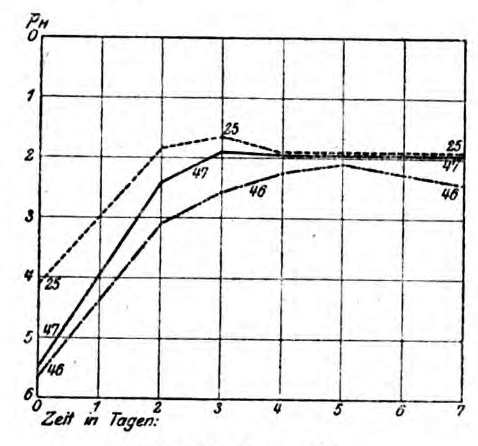


Fig. 3. Kurve III.

Legende zu Kurve III.

	Versuch 46 Dextrose-Pepton	Versuch 47 Dextrose-Pepton-Ammonsulfat
Erntegewichte:		
2. Tag	0,1580 g	0,2450 g
3. „	0,2440 „	0,5385 „
4. „	0,3310 „	0,6890 „
5. „	0,7020 „	0,8000 „

Neßlerreaktion:

2. Tag	—	++ sehr stark
3. „	—	+ Abnahme deutlich!
4. „	—	Nur noch Spuren (schwache Gelbfärbung der Nährlösung)
5. „	—	Nur noch Spuren

Konidienbildung:

2. Tag	Sehr wenig	schneeweiß
5. „	mäßig	weniger als 46

Die p_H-Werte der Versuche 47 und 25 liegen so nahe beieinander, nämlich p_H 1,68 in Versuch 25 und 1,87 in Versuch 47, daß man von einem fast ausschließlichen Verbrauch von Ammonsulfat sprechen kann, daß also Pepton unberührt bleibt. Wenn die immerhin bemerkliche Differenz von 0,19 zwischen den beiden Versuchen besteht, so darf nicht übersehen werden, daß die Ausgangswerte mit p_H 5,53 in Versuch 47 und 4,12 in 25 beträchtlich auseinanderliegen und daß vermutlich Pepton eine gewisse Menge von Wasserstoffionen weggefangen wird. Aus diesen Gründen darf die erwähnte Differenz als unwesentlich betrachtet werden. Auch der Verlauf der beiden Kurven, die, von dem verschiedenen Ausgangspunkt abgesehen, völlig parallel sich verhalten, und der völlig identisch absteigende Ast des zweiten Teils der Kurve sprechen dafür, daß in Pepton-Ammonsulfatgemisch nur Ammonsulfat verarbeitet wird.

Die Erntegewichte lassen deutlich den Einfluß von Ammonsulfat erkennen, das Wachstum erfolgt rascher, aber als Folge der stärkeren ($\overset{+}{H}$) in der Nährlösung wird die Konidienbildung verlangsamt. Bemerkenswert ist ganz besonders das V e r s c h w i n d e n v o n A m m o n i a k i n d e r N ä h r l ö s u n g in Versuch 47; dies zeigt ja allein schon den raschen Verbrauch von Ammonsulfat an. In der Peptonkultur (Versuch 46) tritt in der Versuchszeit kein Ammoniak auf; daher ist auch aus diesen Angaben auf den alleinigen Verbrauch von Ammonsulfat in Versuch 47 zu schließen. Wenn außerdem Ammonsulfat allein verbraucht wird, dann muß es sehr rasch verschwinden, weil 0,25 bis 0,3% Ammonsulfat gerade die nötige Stickstoffmenge liefern, damit der Pilz 5% Dextrose verarbeiten kann. Auch

diese Forderung ist erfüllt, indem, wie die Angaben zeigen, Ammonsulfat bereits am 4. Tag nur noch in Spuren vorhanden ist.

Als gemeinsames Merkmal ist den sämtlichen angeführten Versuchen eigen, daß, wenn Aspergillus niger die Wahl zwischen zwei Stickstoffquellen hat, von denen die eine ein Ammonsalz der starken Mineralsäuren ist, er dann immer das Ammonsalz verbraucht und zwar so ziemlich allein. Daß dabei eine hohe Wasserstoffionenkonzentration entsteht und alle die schädlichen Folgen hoher ($\overset{+}{H}$), wie Auftreten löslicher Stärke in der Nährlösung sowie teilweise Hemmung der Konidienbildung eintreten, zeigt, daß einzig physikalisch-chemische Gesichtspunkte über den Verbrauch der Stickstoffverbindungen entscheiden.

Die Ammonsalze unterscheiden sich nun durch die Größe der Dissoziation beträchtlich von allen anderen verwendeten Stickstoffverbindungen, wie Glykokoll, Acetamid, Pepton. Die Größe der Lipoidlöslichkeit dagegen spielt offenbar keine Rolle, sonst müßte das lipoidlösliche Acetamid dem lipoidunlöslichen Ammonsulfat vorgezogen werden. Als allgemeines Resultat ergibt sich, daß stark dissoziierte Stickstoffverbindungen schwach dissoziierten vorgezogen werden, selbst wenn dabei schädliche Nebenwirkungen, wie starke Säurewirkungen und deren Folgen, z. B. Unterdrückung der Konidienbildung, Bildung löslicher Stärke in der Nährlösung, sich einstellen. Teleologisch gesprochen wird also das schädlich wirkende Ammonsalz den harmlosen organischen Stickstoffverbindungen vorgezogen, auch wenn dabei der Pilz sich stark schädigt oder durch Säure fast vergiftet.

Nachtrag zu unserer 1. Arbeit.

Auf Seite 80 dieser Zeitschrift Bd. 90 1918 haben wir unter den Autoren, die den Lüersschen Standpunkt des Säureoptimums der Hefe bei p_H 2,73 übernommen haben, auch H. v. Euler erwähnt. Euler legt nun brieflich Wert darauf, festgestellt zu sehen, daß er gegenteiliger Ansicht ist. Diese Richtigstellung des Eulerschen Standpunktes wollen wir hiermit erfolgen lassen. Möglich war unsere andere Auffassung, weil aus der angezogenen Stelle bei Euler und Lindner (Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung) der Eulersche Standpunkt nach unserer Meinung nicht völlig klar hervorgeht.

Zur Methodik der chemischen Blutanalyse.

I.

Kritik der Enteiweißungsmethoden.

Von

M. Richter-Quittner.

(Aus dem chem. Laboratorium des Kaiserin-Elisabeth-Spitales in Wien; Vorsteher Prof. Dr. W. Falta.)

(Eingegangen am 15. April 1919.)

Theoretischer Teil.

Eine chemische Blutanalyse muß einer doppelten Aufgabe gerecht werden. Sie muß von chemischen und biologischen Gesichtspunkten aus richtig sein. Als erste Voraussetzung muß die Blutanalytik wohl den Ansprüchen des Chemikers genügen, und ich möchte hier zunächst die Forderung erheben, daß bei allen derartigen Analysen nicht mit dem Ausgangsmaterial gespart werden darf. Bei allen klinischen Untersuchungen ist es gewiß selbstverständliche Pflicht, dem Patienten möglichst wenig Blut zu entnehmen, und es werden daher Mikroverfahren den Vorzug verdienen. Es ist aber meiner Ansicht nach vom rein chemischen Standpunkt aus nicht gleichgültig, ob man z. B. für eine Blutzuckerbestimmung nach Bertrand 30 oder 5 ccm Blut verwendet. Das Blut wird im allgemeinen nach Rona und Michaelis enteiweißt, man arbeitet hier zweckmäßig, um das Auswaschen zu vermeiden, mit aliquoten Teilen und bekommt bei einem Ausgangsmaterial von 30 ccm Blut höchstens 20 ccm Blut zur weiteren Verarbeitung, die ca. 14 mg Zucker enthalten. Kleinere Mengen als 10 mg lassen sich aber mit der Kaliumpermanganatlösung nach Bertrand nicht mehr titrieren, man müßte stark verdünnte Lösungen verwenden und

erhält unsichere Werte. Auch halte ich Kontrollanalysen selbstverständlich für unerläßlich. Ich warne daher vor Verwendungen kleiner Blutmengen bei Makroanalysen. Bei Mikroanalysen halte ich 2 ccm Blut für das äußerste Minimum. Analysen, die in 2 bis 3 Tropfen Blut ausgeführt werden, können meiner Ansicht nach nicht richtig sein, da Blut keine ionisierte Lösung ist und 1 Tropfen Blut niemals mit einem zweiten Tropfen vollkommen identisch sein kann. Auf die Forderungen, die von biologischer Seite aus erhoben werden müssen, kann ich hier nicht eingehen. Die beste chemische Analyse ist wertlos, wenn die biologische Fragestellung falsch ist. Daß vom biologischen Standpunkt weder Vollblut, noch Serumanalysen allein richtig sind, sondern vor allem das Plasma, unter Umständen aber auch noch das Gesamtblut untersucht werden muß, ist von W. Falta[1]) ausführlich dargelegt worden, ebenso, daß bei der Plasmagewinnung die Blutkörperchen nicht geschädigt werden dürfen, da sonst die diffusiblen Substanzen des Plasmas in die Blutkörperchen hineindiffundieren und man im Plasma zu niedrige Werte erhält. Ich will hier nur auf die chemischen Voraussetzungen einer richtigen Blutanalyse eingehen und mich bemühen, zu zeigen, daß eine gute Enteiweißung der Grundstock ist, auf dem wir weiter aufbauen können.

Die Enteiweißung von Blut, Plasma oder Serum ist das wichtigste und zugleich schwierigste Kapitel der ganzen Blutanalytik. Ich konnte mich überzeugen, daß die Richtigkeit einer chemischen Blutanalyse in allererster Linie von der Art der Enteiweißung abhängt. Da die Gegenwart von Eiweißkörpern die Fällungsreaktionen vielfach stört, so müssen die Eiweißkörper vollständig entfernt werden, bevor die übrigen Blutbestandteile untersucht werden können. Es stehen uns hierfür drei prinzipiell verschiedene Wege offen.

1. Zerstörung der Eiweißkörper durch Veraschung auf nassem oder trockenem Wege.
2. Fällung der Eiweißkörper.
3. Dialyse.

[1]) W. Falta, Über die Verteilung der diffusiblen Substanzen auf Körperchen und Plasma im strömenden Blut. Vortrag vom 7. April 1919. (Wiener klin. Wochenschr.)

Die Veraschungsmethode eignet sich ausschließlich für Analysen von anorganischen Bestandteilen wie Chloride, Na, K, Ca usw. und hat daher ein sehr kleines Anwendungsgebiet. Vom biologischen Standpunkt aus sind die Veraschungs- und Fällungsanalysen nicht gleichwertig, da sich ein Teil der anorganischen Salze in organischer Bindung befindet, die bei der Zerstörung des Eiweißes gesprengt wird. Ich verweise hier auf die Arbeiten von Rona über „Das gebundene Ca" und auf unsere Mitteilung über das Vorkommen von gebundenem Chlor im Blutplasma.

Die gebräuchlichsten Veraschungsmethoden sind das Verfahren von Neumann mit Schwefelsäure und Salpetersäure, von Korany mit Kaliumpermanganat und Salpetersäure und die trockene Veraschung von Abderhalden. Ich will auf diese Methoden hier nicht weiter eingehen.

Das Dialysierverfahren hat bis nun keine Anwendung in der Blutanalytik gefunden, doch ist es mir gelungen, eine Dialysiermethode auszuarbeiten, die ich für Reststickstoffbestimmungen empfehlen kann. Ich werde diese Methode an anderer Stelle ausführlicher beschreiben.

Die Fällung der Eiweißkörper findet bisher in der Blutanalytik die allgemeinste Anwendung, so daß man immer diese Methoden vor Augen hat, wenn man von Enteiweißungsmethoden spricht.

Eine gute Enteiweißungsmethode soll folgenden Anforderungen entsprechen:

1. muß alles Eiweiß quantitativ ausgefällt werden, was bei der kolloiden Natur der Eiweißkörper einiger Übung und Geschicklichkeit bedarf;

2. darf bei der ganzen Manipulation wie Erhitzen, Säurezusatz usw. kein Eiweiß wieder in Lösung gehen;

3. dürfen mit dem Eiweiß keine anderen Substanzen wie Harnsäure, Harnstoff usw. mitgefällt werden, die dann der Bestimmung entgehen würden;

4. dürfen keine Fällungsmittel verwendet werden, die an und für sich schon stark adsorbieren;

5. ist bei einigen Untersuchungen, wie z. B. bei den Reststickstoffbestimmungen, darauf zu achten, daß keine Peptone

und Albumosen gebildet werden, die in das Filtrat übergehen und so einen zu hohen Reststickstoff vortäuschen würden.

Es ist ferner darauf zu achten, daß manche Enteiweißungsmethode für eine bestimmte Analyse, z. B. Zucker, sehr gut zu verwenden ist, während sie z. B. bei einer Chloridbestimmung vollständig versagen kann. Dieser Punkt muß mit größtem Nachdruck betont werden. Ich glaube nicht zu übertreiben, wenn ich behaupte, daß ein großer Teil der in der Literatur gemachten Angaben schon vom chemischen Standpunkt aus unrichtig ist, weil die Enteiweißungsmethoden unrichtig angewendet werden.

Die Enteiweißung von Rona und Michaelis bedeutet für Blutzuckerbestimmungen, für die sie ausgearbeitet wurde ein Präzisionsverfahren, während sie für Chloridbestimmungen gänzlich versagt. Die Methode von Schenk mit Sublimat und Salzsäure eignet sich für Zucker, nicht aber für Rest-N-Bestimmungen. Ich gebe auf Grund meiner Erfahrungen folgende Übersicht:

1. Enteiweißung mit Schwermetallsalzen.

1. Methode Schenk . . . . für Zuckerbestimmungen.
2. Methode Abeles . . . . für Zuckerbestimmungen.

2. Kolloidfällung.

Methode Rona und Michaelis . . . . für Zuckerbestimmungen.

3. Hitzekoagulation.

Für alle Analysen mit Ausnahme von Chloriden und Zucker.

4. Enteiweißung mit verdünnten Säuren.

1. Phosphorwolframsäure nach Neuberg und Ishida . . für Harnsäure.
2. Phosphormolybdänsäure nach Bang . . für Rest-N, Zucker, Harnsäure.
3. Methaphosphorsäure nach Oppler . . . . für Chloride.
4. Trichloressigsäure nach Greenwald . . . . für Rest-N.

5. Enteiweißung mit Methylalkohol.

Eigene Methode . . . . für Chloridbestimmung.

6. Dialysierverfahren.

Eigene Methode . . . . für Rest-N.

1. Enteiweißung mit Schwermetallsalzen.

Sehr allgemeine Anwendung finden als Fällungsmittel für Eiweißkörper die Schwermetallsalze, wie Quecksilberchlorid, Eisenchlorid, Bleiacetat, Zinkacetat, Uranylacetat u. a. m. Quecksilberchlorid wurde zum erstenmal von Schenk als Enteiweißungsmittel für Blutzuckerbestimmungen vorgeschlagen und wird seither bei allen möglichen Blutanalysen, insbesondere sehr oft bei Reststickstoffbestimmungen verwendet. Dieses Verfahren leistet ebenso wie die Methode von Abeles mit Zinkacetat und Alkohol für die Blutzuckerbestimmungen ausgezeichnete Dienste, ist aber für die Reststickstoffbestimmungen unbrauchbar. Die Angaben Bangs, daß man bei der Enteiweißung mit Sublimat und Salzsäure nach Schenk viel zu hohe Rest-N-Werte erhält, kann ich zwar nicht bestätigen. Die Vollständigkeit der Eiweißfällung ist von dem Volumen sehr abhängig; ich konnte mich überzeugen, daß bei 10- bis 15 facher Verdünnung und unter Anwendung eines beträchtlichen Überschusses an Sublimat im eingeengten Filtrat mit Ferrocyankalium und Essigsäure absolut kein Eiweiß nachzuweisen ist. Hingegen haben alle Schwermetallsalze die Eigenschaft, Harnsäure, Kreatinin, Harnstoff usw. stark zu adsorbieren. Ich habe bei Enteiweißungsversuchen mit Schwermetallsalzen bei Rest-N-Bestimmungen ausnahmslos viel zu niedrige Werte erhalten. Die Größe der Adsorption hängt ab:

1. von der Dauer der Einwirkung des Fällungsmittels,
2. von der Menge des Fällungsmittels, ein großer Überschuß wirkt stark adsorbierend,
3. von der Natur des Fällungsmittels. Sublimat absorbiert stärker als Zinkacetat.

2. Kolloidfällung.

Die allbekannten Enteiweißungsmethoden von Rona und Michaelis beruhen auf der Eigenschaft der Eiweißkörper, als Kolloide von anderen Kolloiden gefällt zu werden. Das Eiweiß kann als amphoteres Kolloid sowohl von negativen wie von positiven Kolloiden ausgeflockt werden. Diese Methoden haben zwar den Vorteil, daß man bei gewöhnlicher Temperatur arbeitet und so das Erhitzen vermeidet, doch ist hier die Ad-

sorption ganz besonders groß. Alle Kolloide sind ja bekanntlich ganz ausgezeichnete Adsorptionsmittel, so daß man selbstverständlich bei allen derartigen Fällungsmitteln wie Mastix, Kaolin und dem sehr viel angewendeten Ferrum oxydatum dialysatum mit sehr großen Fehlbeträgen rechnen muß, die durch Adsorption hervorgerufen werden. Bei Anwendung von Mastix konnte ich im Filtrat bei 10 verschiedenen Versuchen überhaupt keinen Rest-N nachweisen. Es gilt hier dasselbe, was bei den Schwermetallsalzen gesagt wurde, nur möchte ich noch bemerken, daß die Adsorption bei Anwendung von Ferrum oxydatum dialysatum Merck vor allem von dem Grade der Reinheit des kolloidalen Eisens abhängt (durch Dialyse sehr gut gereinigtes Eisen adsorbiert stärker als weniger gut gereinigtes) und ferner im gewissen Sinne von der Menge des vorhandenen Eiweißes. Wir haben in unserer Untersuchung über die Faserstoffgerinnung die freien Chloride nach Rogée-Fritsch durch Enteiweißung mit Ferrum oxydatum dialysatum bestimmt, doch mußten wir uns nachträglich davon überzeugen, daß diese Methode bei Chloridbestimmungen aus folgenden Gründen Fehler geben kann:

1. ist das Ferrum oxydatum, wie schon erwähnt, unter Umständen besonders für die Chloride ein ausgezeichnetes Adsorptionsmittel;

2. zweitens enthält das Ferrum oxydatum selbst wechselnde Mengen Chlor, die in irgendeiner Form gebunden sind und beim Verdünnen mit Wasser verschieden stark dissoziieren. Wir werden auf diese Tatsachen noch an anderer Stelle ausführlich zu sprechen kommen.

3. Hitzekoagulation.

Die gebräuchlichste Methode der Enteiweißung ist die Koagulation in der Hitze bei schwachsaurer Reaktion. Alle Autoren, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben, berichten über die großen technischen Schwierigkeiten dieses Verfahrens. Die quantitative Enteiweißung hängt davon ab, ob der richtige Säuregrad erreicht ist. Die Reaktion darf nur schwach sauer sein, da durch den geringsten Überschuß an Säure ein Teil des Eiweißes als Acidalbumin in Lösung geht. Während des Erhitzens wird aber ein Teil der Säure durch

das Eiweiß gebunden, so daß man nachsäuern muß. Wichtig ist auch das Volumen und die Dauer des Erhitzens. Kocht man zu lange, so riskiert man eine tiefgreifende Veränderung der Eiweißkörper, Hydrolyse usw., kocht man zu kurz, so ist die Fällung unvollständig. Ich habe nach folgendem modifizierten Verfahren gute Resultate erhalten, muß aber gestehen, daß mir trotz großer Übung Analysen mißglücken und es vorkommt, daß ich 6 Bestimmungen ausführen muß, bevor ich vollkommen eiweißfreie Filtrate und übereinstimmende Werte erhalte.

240 ccm destilliertes Wasser werden mit 10 ccm 1 $^0/_0$iger Essigsäure und 10 ccm 5 $^0/_0$iger Monokaliumphosphatlösung zum Sieden erhitzt. Im Momente des Kochens werden 40 ccm Plasma, die mit 40 ccm halbgesättigter Kochsalzlösung versetzt sind, in dünnem Strahl unter beständigem Umrühren eingetragen. Während des Kochens, das nicht länger als 3 Minuten dauern soll, erhält man durch tropfenweisen Zusatz von 1 $^0/_0$iger Essigsäure die schwachsaure Reaktion aufrecht. Man prüft gegen empfindliches Lackmuspapier, das ich nach der Vorschrift von Sörensen auf folgende Weise bereite. 0,5 g feingepulvertes Azolithmin werden in einer Schale in 200 ccm Wasser, dem 2,5 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge zugesetzt sind, gelöst, filtriert und zum Filtrat 50 ccm Alkohol zugegeben. Durch diese Lösung werden Streifen von aschearmem Filtrierpapier gezogen und auf Schnüren getrocknet. Sodann wird möglichst schnell noch heiß filtriert und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Alle Filtrate werden in einem Meßkolben vereinigt. Man füllt bis zur Marke auf und bestimmt in einem Teil des Filtrates den Stickstoff, während man einen anderen Teil zur Prüfung auf Eiweiß verwendet.

Ich habe 9 verschiedene Verfahren der Hitzekoagulation der Reihe nach durchgeprüft, habe aber in allen Fällen unrichtige, meistens zu hohe Rest-N-Werte erhalten. Die oben beschriebene Methode, die ich im folgenden „Essigsäure-Methode“ nenne, empfehle ich nicht, da sie schwierig und zeitraubend ist und auch viel Blut erfordert. Eine Enteiweißung dauert 2 Stunden und verlangt 160 ccm Blut entsprechend 80 ccm Plasma.

4. Enteiweißung mit verdünnten Säuren.

Ich habe Versuche mit Phosphormolybdänsäure, Metaphosphorsäure und Trichloressigsäure angestellt, um die Befunde von Ivar Bang, Syolema und Hetterschy zu überprüfen. Syolema und Hetterschy finden bei der Enteiweißung mit Phosphormolybdänsäure viel niedrigere Rest-N-Werte als bei der Enteiweißung mit Metaphosphorsäure und erhalten mit Trichloressigsäure ausnahmslos noch höhere Werte. Sie ziehen den Schluß, daß diese 3 Methoden insofern ungleichwertig sind, als Phosphormolybdänsäure uud Metaphosphorsäure auch die Eiweißabbauprodukte fällen. Bang enteiweißt in seinem Mikroverfahren ausschließlich mit Phosphormolybdänsäure und gibt an, daß seine Werte mit den durch Hitzekoagulationen gefundenen sehr gut übereinstimmen. Ich finde im venösen Blut ganz in Übereinstimmung mit Bang, Syolema und Hetterschy Differenzen zwischen diesen 3 Methoden, die im arteriellen Blut kleiner sind. Im Gegensatz zu Bang gebe ich aber der Trichloressigsäure-Methode den Vorzug, da die so für Rest-N erhaltenen Zahlen mit anderen Methoden, z. B. Hitzekoagulation und Dialyse, sehr gut übereinstimmen. Die großen Differenzen verschwinden im arteriellen Blut teilweise. Eine eindeutige Erklärung für diese Resultate kann man heute noch nicht geben. Ich glaube, daß die niedrigen Zahlen bei der Phosphormolybdänsäure-Enteiweißung sich zum Teil auch durch Adsorption erklären lassen. Verwendet man sehr wenig Blut und braucht daher auch wenig Säure, so erhält man bessere Werte. Die Methode von Bang gibt sogar bei einiger Übung sehr gute Resultate, vorausgesetzt, daß man nicht mit 1 bis 2 Tropfen Blut, sondern mit ca. 3 ccm Plasma arbeitet. Die Enteiweißung mit Metaphosphorsäure nach der Vorschrift von Oppler eignet sich nach meinen Erfahrungen sehr gut für die Bestimmung der freien Chloride. Die Enteiweißung mit Trichloressigsäure hat zwar vor der Essigsäuremethode den Vorzug, daß sie leichter zu handhaben ist, weicht aber prinzipiell von ihr nicht ab. Hingegen ist heute Trichloressigsäure nahezu unerhältlich und daher sehr teuer. Eine einzige Enteiweißung mit Trichloressigsäure kommt auf 3 bis 4 Kr.

Meiner Ansicht nach ist die Enteiweißung mit Säuren, wenn es sich um Reststickstoffbestimmungen handelt, immer gewagt, da man sehr leicht durch Bildung von löslichem Acidalbumin zu hohe Werte erhält.

5. Enteiweißung mit Alkohol.

Ich habe in der Literatur 12 verschiedene Modifikationen der Alkoholenteiweißung gefunden, doch konnte ich mich überzeugen, daß keine einzige für Rest-N-Bestimmungen verwendbar ist, da die Enteiweißung nie quantitativ ist und immer kleinere oder größere Mengen von Eiweiß im Filtrat bleiben. Die Methode von Folin mit Methylalkohol und Chlorzink wird leider für Rest-N-Bestimmungen sehr viel verwendet, obwohl der Autor selbst angibt: „Ich bin nicht sicher, ob nicht Spuren von Eiweiß der Fällung entgehen." Diese Spuren von Eiweiß können bei Folins Mikroverfahren 100 bis 200% ausmachen. Ich habe jedoch die Methode von Folin für Chloridbestimmungen mit gutem Erfolg modifiziert. Die Methode gestaltet sich nun wie folgt:

100 ccm Plasma werden im 250-ccm-Meßkolben mit 5 g chem. reinem $MgSO_4$ versetzt, mit Methylalkohol bis zur Marke aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und nach 2 bis 5 Minuten durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Das Filtrat ist immer klar und nahezu eiweißfrei. 100 ccm des Filtrates werden am Wasserbade zur Trockne eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit $^n/_{10}$-$AgNO_3$-Lösung titriert. Diese Methode läßt an Einfachheit nichts zu wünschen übrig. Sie hat vor der Methode von Oppler den großen Vorteil, daß man sofort filtrieren kann und nicht 6 Stunden absetzen lassen muß, und daher nicht riskiert, daß ein Teil der Chloride entbunden wird. Die Methode von Abeles mit Zinkacetat und Alkohol ist für Zuckerbestimmungen sehr zu empfehlen. Es scheint, daß der Alkohol wenigstens innerhalb gewisser Grenzen ein zuverlässiges Mittel zur Fällung der Salze einiger Proteide mit Basen in unverändertem Zustand ist. Dies geht aus Untersuchungen von L. L. Slyke und E. B. Hart hervor, die Alkohol zur Fällung von Calciumcaseinit benutzten und fanden, daß das Präcipitat aus gegen Lackmus neutralen Lösungen genau

so viel Calcium enthält wie der Quantitat des Calciumhydrates entspricht.

Experimenteller Teil.

Ich bin daher der Ansicht, daß es bei einer chemischen Blütanalyse in allererster Linie auf die Art der Enteiweißung ankommt, während die Hunderte von Variationen bei der Bestimmung der einzelnen Blutbestandteile auf das Resultat ohne wesentlichen Einfluß sind. Ob man z. B. die Chloride nach Volhard oder Mohr titriert, den Zucker gravimetrisch nach Pflüger-Allihn oder maßanalytisch nach Bertrand bestimmt, ist meiner Ansicht nach lediglich Sache des individuellen Geschmackes.

1. Blutzuckerbestimmungen.

Die Bestimmung von Zucker im Blute stößt vom chemischen Standpunkt aus durchaus auf keine Schwierigkeiten. Die verschiedenen Enteiweißungsmittel, die bei anderen Blutanalysen versagen, leisten hier ausgezeichnete Dienste, wie die Enteiweißung von Schenk mit Sublimat und Salzsäure, von Rona und Michaelis mit Ferrum oxydatum dialysatum Merck, von Abeles mit Zinkacetat und Alkohol, von Oppler mit Metaphosphorsäure usw., da Zucker praktisch nicht adsorbiert wird, wie aus folgenden Versuchen ersichtlich.

Tabelle I.

Bezeichnung	Methode Schenk		Methode Rona u. Michaelis		Methode Abeles	
		Niederschlag		Niederschlag		Niederschlag
Ascites	12,98 12,99	0	13,00 13,02	0	12,94 12,97	0
Ödemflüssigkeit	20,94 20,96	0	20,79 20,79	0	20,89 20,96	
Pferdeplasma	110,38 110,39	0	110,29 110,34	0	110,37 110,29	0

Die Zuckerwerte sind maßanalytisch nach Bertrand ermittelt. Alle drei Enteiweißungsmethoden sind gleichwertig. Die Methode von Rona und Michaelis ist am meisten zu empfehlen, da sie am einfachsten ist und die wenigsten Chemikalien erfordert. Für Zuckerbestimmungen lassen sich alle

bekannten Enteiweißungsmittel verwenden, bei denen man in der Kälte arbeitet. Beim Erhitzen werden die Saccharide oxydiert.

Die quantitativen Zuckerbestimmungen machen von den verschiedenen Eigenschaften des Zuckers Gebrauch.

1. Polarimetrische Bestimmungen.
2. Colorimetrische Bestimmungen: Methode von Reicher und Stein, L. Waker, Ph. A. Shaffer.
3. Reduktionsmethoden: Methode Pflüger-Allihn, Bertrand, Lehmann-Maquenne.

Betreffs der polarimetrischen Methoden verfüge ich über keine eigenen Erfahrungen. Die colorimetrischen Methoden sind, wie allgemein bekannt, für Zuckerbestimmungen sehr ungenau und nicht einmal für den Arzt zu verwenden. Die Reduktionsmethoden verwenden die Eigenschaft des Zuckers, als Aldehyde alkalische Kupferlösungen zu reduzieren. Die altbewährte gravimetrische Methode von Pflüger-Allihn, bei der das bei der Reduktion entstehende Kupferoxydul gewogen wird, ist immer noch das genaueste und sicherste Verfahren, erfordert aber mindestens 50 ccm Blut oder 50 ccm Plasma (entsprechend 100 ccm Blut). Ebenso gute Werte erhält man auch bei sehr sorgfältigem Arbeiten mit der maßanalytischen Methode von Bertrand, die nur 30 ccm Blut oder Plasma verlangt. Hier müssen die von Bertrand gegebenen Vorschriften peinlich genau eingehalten werden. Man darf nicht länger als 2 Minuten kochen, zu starkes Erhitzen ist zu vermeiden. Die ganzen Manipulationen des Filtrierens, Auswaschens, Wiederlösens müssen möglichst schnell erfolgen, da das Kupferoxydul leicht zu Oxyd oxydiert wird.

Nach der Methode von Lehmann-Maquenne habe ich ausnahmslos etwas zu hohe Werte erhalten, die wohl darauf

Tabelle II.

Datum	Bezeichnung	Pflüger-Allihn	Bertrand	Lehmann-Maquenne
18. II. 18	Ochsenplasma	120,39 120,74	120,06 120,00	121,04 121,09
5. II. 18	Ascites	52,79 52,70	52,74 52,79	53,09 53,21

zurückzuführen sind, daß das Blut Substanzen enthält, die mit dem Jodkalium reagieren. Ich führe hier nur zwei Versuche an, bei denen nach Rona und Michaelis enteiweißt wurde.

Die größte Anwendung finden nach der Literatur zweifellos die Mikromethoden von Bang. Ich werde diese Verfahren an anderer Stelle ausführlich diskutieren.

2. Harnsäurebestimmungen.

Es ist bekannt, daß die Harnsäure im Blut in Form des Mononatriumurates kreist. Dieses wird nicht nur von den Eiweißfällungsmitteln, sondern auch von dem auskoagulierenden Eiweiß selbst in sehr starkem Maße adsorbiert, so daß es technisch unmöglich ist, richtige Resultate zu erhalten. Alle gefundenen Werte sind etwas zu niedrig. Die gebräuchlichsten Methoden der Enteiweißung sind die Hitzekoagulationen mit sehr verdünnter Essigsäure, die Enteiweißung mit Sublimat nach Schenk und mit Ferrum oxydatum dialysatum Merck. Um mir eine Vorstellung über die Adsorptionsverhältnisse zu machen, habe ich mir eine Lösung von Mononatriumurat Kahlbaum hergestellt, deren Harnsäuregehalt ich titrimetrisch nach Hopkins ermittelt hatte, diese mit einer Ovalbuminlösung verdünnt, nach verschiedenen Methoden enteiweißt und im Niederschlag wie im Filtrat die Harnsäure nach Ludwig-Salkowski bestimmt. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Bezeichnung	Hitzekoagulation		Ferrum oxydatum		Sublimat		Phosphorwolframsäure	
	Filtrat	Niederschlag		Niederschlag		Niederschlag		Niederschlag
Ovalbuminlös. mit 0,5000 % Harnsäure	0,4920 0,4972	Murexidprobe ++	0,4021 0,4000	0,0824 0,0879	0,4000 0,4072	0,0321 0,0900	0,4925 0,4920	Murexidprobe ++
Ovalbuminlös. mit 0,0500 % Harnsäure	0,0483 0,0480	Murexidprobe ++	0,0400 0,0410		0,0400 0,0392			
Ovalbuminlös. mit 0,0050 % Harnsäure	0,00477 0,0046	Murexidprobe ++	0,0042 0,0039	Murexidprobe	0,0038 0,0030		0,0045 0,0040	

Zu den Bestimmungen wurden immer 200 ccm Lösung verwendet. Die Versuche zeigen folgendes.

1. Weder Ferrum oxydatum noch Sublimat sind brauchbar, da sie Harnsäure adsorbieren.

2. Die Enteiweißung mit verdünnter Essigsäure in der Hitze und die mit Phosphorwolframsäure geben ziemlich gute Resultate, der Eiweißniederschlag enthält nur minimale Mengen von Harnsäure.

3. Die Adsorption ist naturgemäß immer größer, je mehr Eiweiß vorhanden ist.

4. Die Harnsäurebestimmung nach Ludwig-Salkowski ist ungenau, wodurch die Differenzen in den Kontrollanalysen erklärt werden.

Ich habe nun dieselbe Lösung in derselben Weise enteiweißt, aber nur 10 ccm Lösung verwendet und die Harnsäure colorimetrisch nach Folin und W. Denis bestimmt. Es ergibt sich folgendes:

Tabelle IV.

Bezeichnung	Hitzekoagulation	Ferrum oxydatum	Sublimat
Ovalbuminlösung enthält	0,0048	0,0040	0,0042
0,0050 % Harnsäure	0,0047	0,0040	0,0042

Die Enteiweißung mit Essigsäure gibt also bei darauffolgender colorimetrischer Bestimmung befriedigende Werte.

Tabelle V.

Datum	Ludwig-Salkowski mg	colorim. Folin u. Denis g
18. XII. 18	4,29	6,98
	4,59	6,92
21. XII. 18	5,72	7,95
	5,00	7,98

Die Enteiweißung erfolgte in allen Fällen nach meiner Essigsäuremethode. Die Methode nach Ludwig-Salkowski gibt, wie bekannt, zu niedrige Werte, da die Harnsäure nicht quantitativ auskrystallisiert. Es finden sich in der Literatur

eine große Zahl colorimetrischer Harnsäuremethoden. Ich habe 9 verschiedene Verfahren durchgeprüft und kann die Methode von O. Folin und W. Denis am meisten empfehlen. Die Resultate dieser Versuche werde ich an anderer Stelle im Zusammenhang mit anderen colorimetrischen Methoden mitteilen.

3. Bestimmung der Chloride.

Die Methoden von Rogée-Fritsch und von v. Hößlin zur Bestimmung von Chloriden werden von Ärzten und Physiologen sehr viel angewendet. Beide Methoden, besonders aber die von Rogée-Fritsch, sind unrichtig. Wir können mit diesem Verfahren nur einen Teil des im Gesamtblute oder im Plasma vorhandenen Chlors, die sogenannten „freien Chloride", nachweisen, da ein kleiner Teil der Chloride an die Eiweißkörper des Blutes (Fibrinogenfraktion) gebunden ist und erst bestimmt werden kann, nachdem die Eiweißkörper durch Veraschung zerstört sind. Aber auch die „freien Chloride" lassen sich weder nach Rogée-Fritsch, noch nach v. Hößlin quantitativ bestimmen.

v. Hößlin enteiweißt in der Hitze unter Zusatz von verdünnter Salpetersäure. Es ist zweifellos, daß die Hitzekoagulation von allen Enteiweißungsmethoden technisch am schwierigsten ist, und es ist daher von vornherein ratsam, auf diese Methode zu verzichten, wenn uns einfachere zur Verfügung stehen.

Die Methode von v. Hößlin hat folgende Mängel:

1. Unterliegen die Chloride viel stärker als irgendein anderes Salz der Adsorption, weswegen man nur in der Kälte arbeiten darf, da die Adsorption mit steigender Temperatur zunimmt;

2. Muß bei Chloridbestimmungen vollständig bis auf die letzten Spuren enteiweißt werden, da das Eiweiß mit dem $^n/_{10}$-$AgNO_3$ reagiert und man zu hohe Werte erhalten würde. Bei der Hitzekoagulation läßt sich dies aber schwer erreichen.

Wir bekommen also theoretisch nach dieser Methode entweder zu hohe oder zu niedrige Werte, und nur wenn sich beide Fehler kompensieren, stimmen die gefundenen Zahlen mit den Werten nach Oppler, die ich für richtig halte, überein.

Die Enteiweißungsmethode von Rona und Michaelis mit

Ferrum oxydatum dialysatum wurde von Rogée-Fritsch für Chloridbestimmung vorgeschlagen. Wie schon eingangs erwähnt, ist diese Methode für Chloridbestimmung aus folgenden Gründen wenig geeignet:

1. Enthält das Ferrum oxydatum immer Cl, manchmal sogar ebensoviel oder mehr wie das Blut. Ich habe im Laufe der letzten 4 Jahre über 200 verschiedene Lösungen im Gebrauch gehabt und teile folgende Werte mit, die auf 50 ccm Ferrum oxydatum berechnet wurden, da für eine Enteiweißung von 10 ccm Plasma, Blut usw. 50 ccm Ferrum oxydatum in Anwendung kommen.

Tabelle VI.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.
Chloridgehalt der Ferrum-oxydatum-Lösung	0,016	0,025	0,029	0,057	0,079	0,146	0,147	0,200
Chloridgehalt von 10 ccm Plasma oder Serum	0,0275	0,0420	0,059	0,065	0,047	0,0451	0,038	0,037

2. Dürfte ein Teil des Chlors in kolloidaler Form vorliegen, und es ist leicht verständlich, daß bei der Verdünnung mit Wasser unter verschiedenen Umständen verschiedene Cl-Mengen in den Ionenzustand übergehen. Dafür spricht folgender Versuch:

Es wurde der Cl-Gehalt von 10 ccm einer 10%igen Lösung von Ferrum oxydatum dialysatum Merck unter wechselndem Zusatz von H_2O ermittelt. Es zeigte sich, daß der Chloridgehalt mit steigender Verdünnung steigt.

Tabelle VII.

Wasserzusatz	50 ccm	100 ccm	150 ccm	200 ccm	300 ccm
Chloridgehalt von 10 ccm Ferrum oxydatum	0,040 g	0,046 g	0,047 g	0,049 g	0,053 g

3. wirkt das Ferrum oxydatum als Kolloid auf Elektrolyte sehr stark adsorbierend.

Die Größe der Adsorption hängt ab:

1. Von der Dauer der Einwirkung der Fällungsmittel, wie die Versuche der Tabellen VIII und IX zeigen.

Tabelle VIII.

Bestimmung der Chloride nach Rogée-Fritsch im menschlichen Plasma mit verschiedenen Lösungen von Ferrum oxydatum dialysatum und verschieden langer Einwirkungsdauer.

Richtiger Wert nach Oppler = 0,5104% Chloride.

Dauer der Einwirkung	Lösung I	Lösung II	Lösung III	Lösung IV	Lösung V	Lösung VI
35 Min.	0,4176	0,4444	0,4500	0,4500	0,4561	0,4569
	0,4170	0,4444	0,4500	0,4500	0,4556	0,4569
12 Std.	0,4000	0,4242	0,4316	0,4411	0,4329	0,4391
	0,4000	0,4240	0,4300	0,4416	0,4320	0,4396

Die Lösungen sind nach dem Grade der Reinheit geordnet. Lösung I wurde 12 Tage gegen fließendes HO dialysiert.

Tabelle IX.

Enteiweißung mit Ferrum oxydatum dialysatum Merck.

Bezeichnung	Ferrum oxydatum dialysatum ccm	Dauer der Einwirkung Std.	Rest-N auf 100 ccm mg	Chloride auf 100 ccm g
Verdünnte NaCl-Lösung + Harnstofflösung + Ovalbuminlösung, 10 ccm für eine Bestimmung	200	24	100,00	0,5773
			100,00	0,5470
	100	24	110,43	0,5930
			110,42	0,5931
	50	24	115,74	0,6208
			115,78	0,6200
	200	1/2	105,72	0,6047
			105,70	0,6040
	100	1/2	111,38	0,6149
			111,40	0,6140
	50	1/2	117,98	0,6472
			117,90	0,6470

2. Von der Menge des angewandten Fällungsmittels. Die Versuche der Tabelle IX zeigen, daß ein großer Überschuß stark adsorbierend wirkt.

3. Von der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des Ferrum oxydatum, wie die Versuche der Tabelle VIII zeigen. Ein durch Dialyse möglichst von allen Elektrolyten befreites Ferrum oxydatum adsorbiert besonders stark.

4. Von dem Eiweißgehalt der Lösung. Je mehr Eiweiß, desto größer die Adsorption.

Tabelle X.

Rest-N-Bestimmung in einer Eiweißlösung bei verschiedenem Eiweißgehalt und gleichem Harnstoffgehalt.

Gesamt-N	0,5472 0,5470	1,0941 1,0949	1,5674 1,5670	2,0740 2,0740	2,5906 2,5906	3,6739 3,6741
Rest-N	0,13254 0,13250	0,13077 0,13079	0,13054 0,13050	0,12548 0,12550	0,12074 0,12070	0,11739 0,11738

Tabelle XI.

Vergleich zwischen der Chloridbestimmung im Blut nach Rogée-Fritsch und v. Hößlin.

Nr.	Datum	Bezeichnung	Rogée-Fritsch	v. Hößlin	Bemerkungen
1	IV. 17	Eiweiß-NaCl-Lösung	1,61	1,60	
2	IV. 17	Serum	0,411	0,430	
3	15. IV. 17	Serum	0,596	0,652	
4	22. V. 17	Ödemflüssigkeit	0,634	0,700	
5	X. 17	Ödemflüssigkeit	0,2751	0,2800	
6	9. IV. 18	Plasma	0,5293 0,5289	0,5317 0,5317	
7	18. XII. 18	Ochsenplasma	0,4204 0,4200	0,4400 0,4400	Der v. Hößlin-Wert stimmt mit Oppler überein.
8	20. XII. 18	Katzenplasma	0,3721 0,3721	0,3800 0,3800	Mit einer guten ausprobierten Lösung von Ferrum oxyd.
9	13. XII. 18	Eiweißkochsalzlösung enthalt. 0,5003 % NaCl	0,4726 0,4720	0,4907 0,4900	do.
10	13. XII. 18	Ascites	0,4738 0,4730	0,5192 0,5190	do.
11	20. I. 19	Menschliches Plasma	0,4518 0,4510	0,4729 0,4729	do.

Aus allen diesen Versuchen geht wohl mit Sicherheit hervor, daß die Bestimmungsmethode von Rogée-Fritsch sehr große Fehlerquellen birgt. Die im Handel befindlichen Lösungen des hydrolytischen Eisens sind qualitativ und quantitativ sehr verschieden (derartige Versuche sind noch nicht abgeschlossen); es erscheint mir immerhin möglich, daß man zufällig eine ziemlich brauchbare Lösung in die Hand bekommt. Ich halte es auch nicht für ausgeschlossen, daß man durch einige Kunstgriffe sich bessere Lösungen des kolloidalen Eisens herstellen kann, doch scheinen mir diese Bemühungen zwecklos, da wir ja über gute Verfahren der Chloridbestimmung verfügen. Vergleichswerte mit den beiden Methoden von Rogée-Fritsch und von v. Hößlin befinden sich in Tabelle XI. Die Rogée-Fritsch-Werte sind ausnahmslos niedriger.

Tabelle XII.

Bestimmung der freien Chloride nach verschiedenen Methoden.

Datum	Bezeichnung	Rogée-Fritsch	v. Hößlin	Oppler	Mod. Folin	Bang
27. XI. 18	Pferdeplasma	0,3274 0,3270	0,3670 0,3670	0,4091 0,4090		
13. XII. 18	Ascites	0,4738 0,4730	0,5192 0,5190	0,5109 0,5100		
13. XII. 18	Eiweißlösung, enthaltend 0,5003 % NaCl	0,4726 0,4720	0,4907 0,4900	0,4997 0,4998		
16. XII. 18	Menschliches Plasma	0,4444 0,4444	0,4972 0,4970	0,5103 0,5100		
18. XII. 18	Ochsenplasma	0,4204 0,4200	0,4400 0,4400	0,4416 0,4416		0,4400 0,4400
20. XII. 18	Katzenplasma	0,3721 0,3721	0,3800 0,3800	0,3809 0,3809		
21. II. 19	Pleuritisches Exsudat	0,3876 0,3876	0,4292 0,4291	0,4200 0,4200		
27. II. 19	Ödemflüssigkeit		0,6019 0,6019	0,5974 0,5970		0,5839 0,5800
10. III. 19	Menschliches Plasma		0,5102 0,5109	0,5090 0,5090	0,5092 0,5091	
4. III. 19	Ascites	0,4439 0,4439	0,4624 0,4621	0,4599 0,4598	0,4598 0,4597	
24. III. 19	Ascites	0,4462 0,4462	0,4800 0,4800	0,4702 0,4709	0,4709 0,4702	

Sehr zu empfehlen ist die Methode von **Oppler**, bei der in der Kälte mit 4 % Metaphosphorsäure enteiweißt wird. Die von mir modifizierte Methylalkoholenteiweißung gibt auch gute Resultate. Ich gebe in Tabelle XII eine Übersicht über die verschiedenen Methoden.

4. Bestimmung des Reststickstoffes.

Unter Reststickstoff des Blutes versteht man den nicht koagulablen Stickstoff, die Summe aller N-haltigen Bestandteile des Blutes mit Ausnahme der Eiweißkörper. Ob man die Albumosen und Peptone dem Rest-N zurechnen soll oder nicht, ist noch nicht entschieden. Ich will auf die Frage hier nicht eingehen, da Albumosen und Peptone meist nur spurenweise im Blute vorhanden sind. Von allen Blutanalysen ist die Reststickstoffbestimmung sicher die schwierigste. Die wichtigsten Faktoren des Rest-N sind Harnstoff, Harnsäure, Aminosäuren, Kreatinin und Ammoniak. Dies sind der Hauptsache nach gut krystallisierende Verbindungen, die der Adsorption sehr stark unterliegen. Wir dürfen daher weder mit Schwermetallsalzen, noch mit kolloidalen Metallen enteiweißen, da diese alle Elektrolyte sehr stark adsorbieren. Bei allen anderen Enteiweißungsmitteln ist es aber nur sehr schwer zu vermeiden, daß nicht Spuren von Eiweiß der Fällung entgehen. Ich halte von 136 Fällungsmitteln, die ich in der Literatur gefunden habe, nur zwei für brauchbar, und zwar die Enteiweißung mit Trichloressigsäure nach **Greenwald** und die Essigsäuremethode; alle anderen geben teils zu hohe, teils zu niedrige Werte. Auch diese beiden Methoden können den Anforderungen nicht ganz entsprechen, da das Eiweiß als Kolloid immer mehr oder weniger stark adsorbierend wirken muß und es anderseits unendlich schwierig ist, ein Kolloid quantitativ bis auf die letzten Spuren auszuflocken. Deswegen würde ich mich auf *eine* Reststickstoffbestimmung, auch wenn die Kontrollanalysen noch so gut stimmen, nie verlassen. Will man sichere Werte erhalten, so muß man den Reststickstoff nach zwei zuverlässigen Methoden bestimmen. Die bequemste Methode der Reststickstoffbestimmung ist meiner Ansicht nach die Dialyse, die sehr einfach ist und nur 2 bis 3 ccm Plasma erfordert.

Wenn man bedenkt, was für große diagnostische und pro-

gnostische Bedeutung den Reststickstoffbestimmungen in der Klinik und Therapie der Nephritiden zugeschrieben wird, so wird mir gewiß jedermann recht geben, wenn ich behaupte, daß man gerade hier angesichts der großen technischen Schwierigkeiten mit größter Sorgfalt und Gewissenhaftigkeit arbeiten muß. Ich habe in Tabelle XIII Reststickstoffbestimmungen bei Gesunden nach den Literaturangaben zusammengestellt, um zu zeigen, daß die verschiedenen Autoren verschiedene Werte bei Normalen finden.

Tabelle XIII.

Reststickstoffbestimmungen bei Gesunden nach Literaturangaben.

Jahr	Autor	Rest-N	Methodik
1899	Schöndorff	50 mg in 100 ccm Blut	Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure, N nach Kjeldahl.
1911	Hohlweg	41 bis 60 mg in 100 ccm Serum	Hitzekoagulation unter Zusatz von CH_3COOH, NaH_2OOH und NaCl, N nach Kjeldahl.
1913	Philipp	32 mg in 100 ccm Serum	Enteiweißung mit der 4fachen Menge Phosphorwolframsäure.
1905	v. Rzentkowski	22,6 bis 66 mg in 100 ccm Blut	Hitzekoagulation mit CH_3COOH und NaCl.
1913	O. Folin	22,0 bis 26,0 mg in 100 ccm Blut	Enteiweißung mit Methylalkohol und Chlorzink.
1915	Wolf	25 bis 28 mg in 100 ccm Blut	keine Angabe
1916	Ivar Bang	15 bis 32 mg in 100 ccm Blut oder Serum	Enteiweißung mit Phosphormolybdänsäure mikro- und makroanalytisch.
1916	Schenk	20 bis 40 mg in 100 ccm Serum	Methode Folin mit Methylalkohol und Chloride.
1917	Taylor	25 bis 28 mg in 100 ccm Blut	keine Angabe
1917	Hulton	25 bis 28 mg in 100 ccm Blut	dto.
1918	Feigl	20 bis 30 mg in 100 ccm Blut	Mikromethode von Bang.
1918	Gettler	30 bis 45 mg in 100 ccm Blut oder Serum	Enteiweißung nach Schenk.
1918	Volhard	30 mg in 100 ccm Blut	Methode Folin.
1919	Brun	24 bis 35 mg in 100 ccm Serum	Methode Schenk.

Tabelle XIV.

Bestimmung des Reststickstoffes nach verschiedenen Enteiweißungsmethoden.

Nr.	Datum	Bezeichnung	Diagnose	$HgCl_2$	Ferrum oxydatum	Phosphormolybdänsäure	Metaphosphorsäure	Trichloressigsäure	Methylalkohol	CH_3COOH	Dialyse
1	25. X. 18	Pferdeplasma		74,00 74,10	74,38 74,29			75,48 75,40	76,29 76,30		75,40 75,48 } 24 Std.
2	11. XI. 18	Ochsenplasma		43,71 43,70	43,56 43,50	45,20 45,20	55,72 55,00	60,38 60,38	69,74 69,98	60,54 60,50	60,01 60,04
3	18. XI. 18	Plasma v. K. Winter	Diabetes mellitus			48,37 48,37	50,22 50,29	54,92 54,99		54,67 54,69	54,69 54,69
4	18. XI. 18	Pferdeplasma		69,84 69,80	70,00 70,00	70,54 70,56	79,48 79,40	83,27 83,19	89,94 89,90	83,31 83,27	83,30 83,30
5	22. XI. 18	Johann Popp	Nephritis Hyperton. Ödeme	197,54 197,50	198,31 198,30	199,04 199,04	199,91 199,90	200,07 200,08	210,47 210,40	200,09 200,00	199,48 199,40
6	22. XI. 18	Pferdeplasma		65,47 65,40	65,51 65,59	69,84 69,80	72,43 72,40	73,50 73,46	76,54 76,59	72,50 73,46	73,02 73,04
7	27. XI. 18	Pferdeplasma		73,99 73,90	70,29 70,20	94,38 94,29	100,62 100,60	103,29 103,20		105,62 105,60	103,33 103,30
8	11.XII. 18	Julie Behoč	Grippe	185,74 185,70		189,72 189,70	190,39 190,40	194,67 194,60	240,38 240,20	198,96 198,94	198,79 198,70
9	13.XII. 18	Ascites von Franciska Sekyra		12,54 12,50	11,32 11,30	21,00 21,14		19,79 19,82			19,71 19,74
10	18.XII. 18	Ochsenplasma		32,84 32,89	32,79 32,71	44,71 44,70	45,41 45,49	45,44 45,40	49,38 49,41	45,60 45,51	45,49 45,38
11	16.XII. 18	Knessek	Erythrämie		16,39 16,30	20,20 20,31	19,74 19,71	20,74 20,69			20,31 20,30
12		Eiweiß Harnstofflösung (140,00 mg)		132,47 132,40	129,45 129,40	137,48 137,40	138,00 128,10	139,84 139,80	150,39 150,38	139,80 139,80	139,47 139,40
13	21.XII. 18	Katzenplasma		17,29 17,00	17,34 17,30	18,14 18,10	18,29 18,20	19,08 19,01	20,48 20,41	19,07 19,08	19,71 19,20
14	8. I. 19	Hundeplasma		24,38 24,39	24,09 24,14	24,10 24,00	25,08 25,09	25,56 25,59	26,09 26,08	25,29 25,29	25,09 25,08
	8. I. 19	Ochsenplasma (arteriell)				55,39 55,28	55,97 55,98			55,82 55,71	55,39 55,29
	18. II. 19	Pleuritisches Punktat				15,72 15,79				15,74 15,69	15,82 15,76
	20. II. 19	Ödemflüssigkeit				15,90 15,79				15,98 15,90	18,82 18,83

Tabelle XIV (Fortsetzung).

Nr.	Datum	Bezeichnung	Diagnose	$HgCl_2$	Ferrum oxydatum	Phosphormolybdänsäure	Metaphosphorsäure	Trichloressigsäure	Methylalkohol	CH_3COOH	Dialyse
	5. III. 19	Ascites	Myodegenerat. cordis			17,38 17,30	18,00 18,25			18,94 18,90	18,91 18,99
	21. II. 19	Pleuritisches Exsudat				21,07 21,08				22,94 22,85	22,74 22,68
	10. III. 19	Ochsenplasma arteriell				54,72 54,70	53,98 55,02			54,92 54,78	54,39 54,28

Tabelle XIV gibt eine Übersicht über die verschiedenen Methoden. Es zeigt sich, daß die Enteiweißung mit Sublimat nach Schenk, mit Ferrum oxydatum dialysatum, Phosphormolybdän und Metaphosphorsäure zu niedrige Werte ergibt, während die Enteiweißung mit Trichloressigsäure, die Essigsäuremethode und das Dialysierverfahren sehr gut übereinstimmen. Dieselben Resultate zeigen Tabellen XV und XVI.

Tabelle XV.

Bestimmung des Rest-N in serösen Körperflüssigheiten.

Datum	Name	Diagnose	Bezeichnung	N	H_2O	Rest-N			
						CCl_3COOH	CH_3COOH	Dialyse	Phosphormolybdän
13. XII. 18	Franziska Sek.		Ascites			19,79 19,82	19,72 19,63	19,71 19,74	21,00 21,14
5. II. 19	Therese Gabri		Ascites		93,54 93,54		45,79 45,78	45,68 45,39	45,72 45,70
18. II. 19	Josefine Smol.	Pleuritis	Exsudat	0,947 0,947			15,74 15,69	15,82 15,76	15,72 15,79
20. II. 19	Mathilde Schmi.		Ödem		91,06 91,06		15,98 15,90	15,82 15,83	15,90 15,79
21. II. 19	Therese Eb.	Pleuritis	Exsudat				22,94 22,85	22,74 22,68	21,07 21,08
5. III. 19	Anton Hirsch	Myodegenerat. cordis	Ascites	0.999 0,999			18,94 18,90	18,91 18,99	17,38 17,30

Tabelle XVI.

Rest-N-Bestimmungen bei verschiedenen Erkrankungen.

Datum	Name	Diagnose	Alter	Vollblut		Plasma		Serum	
				CH_3COOH	Dialyse	CH_3COOH	Dialyse	CH_3COOH	Dialyse
14. II. 18	Josefa Door	Grippe				240,00 240,09	239,48 239,40	248,74 248,70	248,71 248,76
8. II. 19	Leopold Schim	Abgeklungene Grippe		23,74 23,70		36,92 36,85	36,52 36,50		
10. I. 19	Anna Haud.	Nephritis acuta		117,29 117,20	117,20 117,20	135,98 135,92	135,00 135,00		
12. II. 19	Rosa Fr.	Nephritis		75,02 75,31		130,74 130,62	130,67 130,72		
18. II. 19	Mathilde Schm.	Normal		15,09	15,82 15,80	27,95 27,93	27,94 27,69		
29. III. 19	Emilie Pf.	Nephritis		53,92 53,91		100,56 100,52	100,59 100,41	100,00 100,21	100,54 100,27

Die Stickstoffbestimmungen wurden entweder nach Kjeldahl oder nach Pregl ausgeführt. Beide Methoden sind identisch. Die Resultate dieser Versuche werde ich in der nächsten Mitteilung bringen. Kurz erwähnen möchte ich noch den merkwürdigen Befund vieler Autoren, daß der Rest-N-Gehalt des Serums und des Gesamtblutes nahezu gleich ist, woraus folgen würde, daß die Blutkörperchen ebensoviel Rest-N enthalten wie das Plasma. Wir können aber diese Angaben nicht bestätigen, wie aus Tabelle XVI hervorgeht. W. Falta hat an anderer Stelle ausführlich über die Verteilung von Chloriden, Zucker, Rest-N auf Blutkörperchen und Plasma berichtet.

5. Einfluß der gerinnungshemmenden Mittel.

Zum Schlusse seien mir noch einige Bemerkungen über den Einfluß der gerinnungshemmenden Mittel auf die einzelnen Blutbestandteile gestattet. Wir können das Blut durch folgende Mittel ungerinnbar machen:

1. Indem wir das Blut mit Hirudin auffangen.
2. Durch Zusatz einiger kalkfällender Salze, wie Natriumfluorid, Natriumoxalat, Ammonoxalat, Natriumcitrat usw.
3. Durch Defibrinieren.

Vom biologischen Standpunkt aus ist es nicht gleichgültig, auf welche Weise man das Blut ungerinnbar macht, da sich

insbesondere das Natriumfluorid und Oxalat als starke Zellgifte erwiesen haben, die die Blutkörperchen schädigen. Alle Salze bringen die Blutkörperchen zum Schrumpfen, so daß man bei Hämatokritbestimmungen zu niedrige Werte erhält, wie folgende Versuche zeigen.

Tabelle XVII.

Blutkörperchenvolumen.

	Ohne Vorlage %	3 % Na-Oxalat %	1 % Na-Oxalat %	Hirudin %
Normal	43	40	42	43
Kriegsödem	44	40	41	
Diabetes mellitus		40	42	44
	37	36,2		37,5

Als ideales Mittel hat sich Hirudin[1]) erwiesen, das in der Mehrzahl der Fälle zur Anwendung kam (0,02 bis 0,5 g auf 100 ccm). Vom Defibrinieren des Blutes durch Schlagen haben wir abgesehen, da es von vornherein wahrscheinlich war, daß die Blutkörperchen durch das Schlagen geschädigt werden. Vom chemischen Standpunkt erscheinen die verschiedenen, die Gerinnung hemmenden Mittel ziemlich indifferent, wie Tabelle XVIII zeigt.

Tabelle XVIII.

Einfluß der gerinnungshemmenden Mittel auf die Bestimmung von Chloriden und Rest-N-Bestimmungen im Ochsenplasma 21. XII. 18.

	Chloride			Rest-N	
	Ferrum oxydatum	Oppler	Koranyi	CCl_3COOH	CH_3COOH
0,03 g Hirudin	0,4723	0,4916	0,5172	45,72	45,98
auf 100 ccm Blut	0,4728	0,4918	0,5172	45,70	45,90
3 g Natriumoxalat	0,4691	0,4927	0,5210	45,70	45,79
auf 100 ccm Blut	0,4690	0,4929	0,5208	45,72	45,74
1 g Natriumoxalat	0,4699	0,4920	0,5181		
auf 100 ccm Blut	0,4699	0,4917	0,5178		
1 g NaF	0,4692			45,70	
auf 100 ccm Blut	0,4690			45,71	
2,5 g Ammoncitrat	0,4700				
	0,4706				
2 g Natriumcitrat	0,4704				
	0,4700				

[1]) Das Hirudin wurde uns von der Firma E. Sachsse in Leipzig in liebenswürdiger Wesie zur Verfügung gestellt.

Literatur.

1. E. Abderhalden, Der Nachweis der freien Aminosäuren im Blut unter normalen Verhältnissen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 478, 1913.

2. Askoli, Zur Methodik und Bedeutung der Blutanalysen. Arch. f. d. ges. Physiol. 87, 103, 1901.

3. Abeles, Über ein Verfahren zum Enteiweißen des Blutes für die Zuckerbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15. 495, 1891.

4. Ivar Bang, Mikrochemische Stickstoffbestimmung. Diese Zeitschr. 88, 416, 1918.

5. Derselbe, Über die Verteilung des Rest-N zwischen Blutkörperchen und Plasma. Diese Zeitschr. 74, 294, 1916.

6. Derselbe, Untersuchungen über den Rest-N des Blutes I bis V. Diese Zeitschr. 72, 104, 119, 129, 139, 146, 1916.

7. Brugsch und Schittenhelm, Nachweis der Harnsäure im Blut. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 4, 12, 1910.

8. E. Becher, Über den Rest-N-Gehalt der Organe und Gewebe bei normalen nephrektomierten Hunden. Arch. f. klin. Med. 128, 1, 1918.

9. St. v. Bogdandy, Bestimmung der Chloride und Bromide in organischen Flüssigkeiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 11, 1913.

10. Gustav Brun, Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt des Blutserums und der Cerebrospinalflüssigkeit an Rest-N bei Nierenkranken. Berl. klin. Wochenschr. Nr. 5, 105, 1919.

11. O. Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper 1911.

12. W. Falta und M. Richter-Quittner, Studien über die Faserstoffgerinnung. Diese Zeitschr. 91, 381, 1918.

13. Johann Feigl, Neue Beiträge zur Kenntnis des Rest-N, der Blutflüssigkeit usw. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 83, 168, 190, 257, 299, 271, 317, 335, 1918.

14. O. Folin und W. Denis, A New Colorimetric Method for the Determination of Uric Acid in Blood. Journ. of Biolog. Chem. 13, 469, 1912.

15. Deiselbe, New Methods for the Determination of Total non Protein Nitrogen Urea and Ammoniac in Blood. Journ. of Biolog. Chem. 88, 199, 1913.

16. Grießbach und H. Strasser, Zur Methodik der Blutzuckerbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 199, 1913.

17. Gutmann und F. Schlesinger, Über die Bestimmung des Chlors im Blutserum. Diese Zeitschr. 60, 283, 1914.

18. Hohlweg und H. Meyer, Quantitative Untersuchung über den Reststickstoff. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 381, 1918.

19. E. Herzfeld, Nachweis von Harnsäure im Blutserum und in serösen Flüssigkeiten. Centralbl. f. inn. Med. Nr. 26, 645, 1912.

20. Derselbe, Eine quantitative Zuckerbestimmungsmethode im Blut. Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 420, 1912.

21. H. v. Hößlin, Chlorbestimmung im Blut. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8. 431, 1906.

22. B. Syolema und W. G. Hetterschy, Über die Bestimmung von Rest-N im Blut. Diese Zeitschr. **84**, 371, 1917.

23. N. Kowalewsky, Essigsaures Uranoxyd, ein Reagens auf Albuminstoffe. Zeitschr. f. anal. Chem. **24**, 551, 1885.

24. Fritz Lippich, Über die Fällung von Eiweiß mit Zinksulfat. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. **74**, 360, 1911. II. Ebenda **90**, 236, 1914.

25. Robert v. Lewis and St. R. Benedikt, A Method for the Estimation of Sugar in Small Quantities of Blood. Journ. of Biolog. Chem. **20**, 61, 1916.

26. K. O. Lasson, Ein Verfahren zur Chlorbestimmung im Harn und Blut. Diese Zeitschr. **49**. 479, 1913.

27. K. Möckel und E. Frank, Ein einfaches Verfahren der Blutzuckerbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 323, 1910.

28. C. Neuberg und Ishida, Enteiweißung mit Mercuriacetat und Phosphorwolframsäure. Diese Zeitschr. **37**, 165, 1911.

29. B. Oppler, Die quantitative Bestimmung der Chlorionen im Blut. Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. **7**, 7, 27, 1913.

30. Derselbe, Bestimmung des Traubenzuckers im Harn und Blut. Zeitschr. f. physiol. Chem. **75**, 71, 1911.

31. Rudolf Philipp, Über den Stickstoff des enteiweißten Blutserums. Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**, 495, 1913.

32. E. Pflüger, Die gravimetrische Zuckerbestimmung. Arch. f. d. ges. Physiol. **69**, 399, 1898.

33. S. Gutmann und F. Schlesinger. Über die Bestimmung des Chlors im Blutserum. Diese Zeitschr. **60**. 283, 1914.

34. Rohrmann, Über die Bestimmung des Zuckers im Blut. Centralbl. f. Physiol. **4**, 12, 1890.

35. Rogée und Fritsch, Eine neue Makro- und Mikromethode zur quantitativen Bestimmung des Chlors im Blut. Diese Zeitschr. **44**, 53, 1913.

36. P. Rona und L. Michaelis, Enteiweißung mittels Kaolin und kolloidalem Eisenhydroxyd. Diese Zeitschr. **7**, 329, 1908.

37. Dieselben, Weitere Beiträge zur Methodik der Enteiweißung. Diese Zeitschr. **5**, 365, 1907.

38. Dieselben, Methoden zur Entfernung von Kolloiden aus ihren Lösungen usw. Diese Zeitschr. **2**, 219, 1907.

39. Phillip A. Shaffer, On the Determination of Sugar in Blood. Journ. of Biolog. Chem. **19**, 284, 1911.

40. Fritz Schenk, Über die Zuckerbestimmung im Blut. Arch. f. d. ges. Physiol. **47**, 621, 1890; **55**, 203, 1893.

41. J. Seegin, Die Enteiweißung des Blutes zum Behufe der Zuckerbestimmung. Centralbl. f. Physiol. **6**, 501, 1892.

42. Julius Schütz, Zur Kenntnis der quantitativen Pepsinwirkung. Zeitschr. Arch. **30**, 5, 1900.

43. E. Wechsler, Zur Technik der Phosphorwolframsäurefällung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 138, 1911.

44. M. Christine Tebb, The Precipitation of Proteids by Alcohol and certain other Reagents. Journ. of Physiol. **30**, 25, 1904.

Beitrag zur Kenntnis der Hämagglutinine und Hämolysine.

Von

Anna Vécsei.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität in Budapest.)

(*Eingegangen am 15. April 1919.*)

Die Isolierung und Reinigung der Immunkörper wurde schon vor längerer Zeit versucht. E. Pick[1]) teilte im Jahre 1902 seine Versuche mit, die sich auf die Isolierung der Typhus- und Cholera-Immunagglutinine bezogen. Er fand die Agglutinine größtenteils in dem im Serum hergestellten Pseudoglobulinniederschlag, und er reinigte diesen Niederschlag durch wiederholte Auflösung und Ausfällung mit Ammonsulfat und Alkohol. Durch dieses Verfahren erhielt er eine relativ eiweißarme Lösung, die ungefähr $^1/_8$ der ursprünglichen Agglutininmenge des Serums enthielt. Diese Lösung enthielt aber noch koagulables Eiweiß und gab Biuret- und Millonsche Reaktion. Versuchte er aber die Eiweißkörper ganz zu eliminieren, so schwand auch die agglutinierende Wirksamkeit der Lösung.

Hahn und Trommsdorf[2]) versuchten das Agglutinin aus agglutinierten Typhus- und Cholerabakterien durch Digestion mit Serum verschiedener Tierspezies, sowie durch verdünnte Säuren und Laugen zu extrahieren. Mit der letztgenannten Methode erhielten sie auch schwach agglutinierende Lösungen.

Die Hämagglutinine zu isolieren versuchten zuerst Landsteiner und Jagič[3]). Sie isolierten die Agglutinine aus den agglutinierten Blutkörperchen durch Digestion mit physiologischer Kochsalzlösung bei einer Wärme von 45° C. Durch diese Methode gewonnene Lösung ent-

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 1902.

[2]) Münch. med. Wochenschr. **1900**.

[3]) Münch. med. Wochenschr. **1913**, Heft 18.

hielt auch Eiweiß, das sie von den Agglutininen zu trennen nicht vermochten.

Liebermann und Fenyvessy[1]) extrahierten die Immunkörper aus den agglutinierten Blutkörperchen mit verdünnter Salzsäure und haben sie auch in trockenem Zustand gewonnen. Ihre Lösung hatte eine sehr gute agglutinierende und hämolytische Wirkung, und es konnte darin kein Eiweiß mehr nachgewiesen werden. Da also diese Methode offenbar zu den relativ reinsten Produkten führt, habe ich sie zu meinen Versuchen verwendet, deren Ziel es war, einerseits die Frage, ob die in Rede stehenden Immunkörper Eiweißkörper sind, definitiv zu entscheiden, andererseits über ihre Eigenschaften und chemische Zusammensetzung neue Daten beizubringen, soweit dies bei der Schwierigkeit, genügendes Material zu beschaffen, möglich war.

Der Gang meiner Versuche war folgender:

Kaninchen wurden gegen Schweineblutkörperchen immunisiert, und zwar wurden von 25$^0/_0$ Schweineblutkörperchenemulsion 4 ccm und nach 4 Tagen 5 ccm in die Ohrvenen der Tiere injiziert. 6 Tage nach der zweiten Injektion — als die Agglutinationswirkung der Sera der Tiere den Wert 1 : 800, die hämatolytische Wirkung den Wert 1 : 1250 erreichte — wurde jeden zweiten Tag Blut aus den Ohrvenen der Tiere entnommen und die Sera gesammelt. So habe ich von 7 Kaninchen 350 ccm Immunserum gewonnen, die ich in mehreren Fraktionen verarbeitete.

Die Isolierung der Immunkörper habe ich, wie schon gesagt, nach dem Verfahren von Liebermann und Fenyvessy folgendermaßen vorgenommen: Das inaktivierte Serum wurde mit der doppelten Menge 5$^0/_0$ige Blutkörperchenemulsion versehen und 1 Stunde lang im Brutschrank gehalten. Die agglutinierte Masse wurde zentrifugiert und mit physiologischer Kochsalzlösung 3 mal gewaschen. Hierauf wurden die Agglutinine mit $^n/_{100}$-Salzsäure extrahiert[2]) und die Blutkörperchen aus der salzsäurigen Lösung abzentrifugiert. Die Lösung wurde mit $^n/_{100}$-Natronlauge neutralisiert und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, die Lösung mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt, zentrifugiert, der Äther von der saueren Lösung abgegossen und die Lösung mit Lauge neutra-

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. 47, Heft 2.

[2]) Damit die Auflösung der Blutkörper vermieden werde, wurden sämtliche Reagenzien mit physiologischer Kochsalzlösung bereitet.

lisiert. War die Lösung in diesem Stadium nicht ganz farblos, so wurde die Ausschüttelung mit Äther wiederholt und der Äther nachher verdampft.

Sodann wurde die Lösung gegen destilliertes Wasser so lange dialysiert, bis darin mit Silbernitrat kein Chlor mehr nachgewiesen werden konnte. Nachher wurde die Lösung eingetrocknet und die gewonnenen Trockensubstanzen gesammelt. Die bearbeiteten 350 ccm Immunsera haben 0,1639 g Trockensubstanz ergeben.

Die chemische Untersuchung der Trockensubstanz hat folgendes ergeben: sie ist in destilliertem Wasser schwer löslich, (kaum $^1/_4$ [23 $^0/_0$] löst sich) hingegen ziemlich leicht in physiologischer Kochsalzlösung, die mehr als $^3/_4$ (88 $^0/_0$) löst, sowie in konzentrierter Essigsäure und Salpetersäure und in heißer verdünnter Natronlauge. In Äther und Alkohol ist sie unlöslich. Die Reaktion der Trockensubstanz ist sauer, auf feuchte Lackmusstreifen gebracht, rötet sie diese. Die wäßrige und kochsalzhaltige Lösung verhält sich jedoch gegen die Lackmusstreifen neutral.

Der Aschengehalt ist groß. 15,6 mg verbrannt geben 4,6 mg Asche, was 29,48 $^0/_0$ entspricht. Die Reaktion der Asche ist bei der Untersuchung mit feuchten Lackmusstreifen entschieden alkalisch. Die Asche löst sich in Wasser nur teilweise, aber leicht in verdünnten Säuren.

Um etwa vorhandenen locker gebundenen Schwefel nachzuweisen, habe ich 4,8 mg Substanz mit Kalilauge gekocht und auf eine Silberplatte geträpfelt. Die Silberplatte ist nicht schwarz geworden. Auch beim Erhitzen mit einer Bleilösung war keine Schwärzung zu beobachten. Mit 3 mg Globulin habe ich Kontrollproben vorgenommen, die ein positives Resultat ergaben. Die Substanz enthält also keinen locker gebundenen bleischwärzenden Schwefel.

Zum Nachweis des in Form von Sulfaten gebundenen Schwefels habe ich das Material mit 1 Teil Salpeter und 2 Teilen Soda zusammengeschmolzen. In der Lösung der Schmelze war Schwefelsäure nachzuweisen, mehr als in einer Kontrollprobe mit der gleichen Menge Serumglobulin. Die Sulfate sind jedoch im Material nicht nur in organischer Bindung vorhanden, sondern sind auch ohne Aufschließen in den

(mit physiologischer NaCl-Lösung) bereiteten Lösungen mit Chlorbarium nachweisbar.

Zur Bestimmung der Phosphorsäure habe ich 10,6 mg Trockensubstanz eingeäschert. Die Asche wurde in Salpetersäure aufgelöst und mit Ammoniummolybdatlösung vermengt. Es konnten so Spuren von Phosphorsäure nachgewiesen werden.

Zum Nachweis des Eisens habe ich 15,6 mg Trockensubstanz verbrannt, die Asche in Salzsäure gelöst und einige Tropfen Rhodankaliumlösung hinzugegeben, wodurch eine schwach rötliche Färbung entstand.

Die quantitative Bestimmung des Eisens habe ich colorimetrisch in der Weise ausgeführt, daß ich in eine Eprouvette, die dieselben Mengen Salzsäure und Rhodankalium enthielt, tropfenweise eine Eisenchloridlösung, die in jedem Kubikzentimeter 0,1 mg Eisen enthielt, so lange tröpfelte, bis ich eine der mit der Asche gewonnenen Reaktion entsprechende Färbung bekam. Auf diese Weise konnte ich 0,015 mg Eisen nachweisen. Dies entspricht auf das Gewicht der Asche gerechnet 0,32 % und auf die ursprüngliche Trockensubstanz gerechnet 0,96 ‰.

Außer Eisen konnte keine andere Base als Natrium nachgewiesen werden. Die Untersuchung auf Calcium und Magnesium ergab ein negatives Resultat.

Zum Nachweis des Stickstoffs habe ich 4,8 mg Trockensubstanz mit Natronkalk verrieben und erhitzt. Ein feuchter roter Lackmusstreifen wurde stark blau. Die quantitative Bestimmung geschah nach Kjeldahl. Vorher habe ich 2 Kontrollproben mit je 10 mg Serumglobulin ausgeführt, und nur als es sicher war, daß das Resultat auch bei Anwendung so kleiner Mengen Materials genau wird, machte ich zwei Parallelbestimmungen mit je 10 mg der Trockensubstanz. Das Resultat ergab 1,058 mg Stickstoff in 10 mg Trockensubstanz. Dies entspricht auf aschenfreies Material berechnet 14,69 % N.

Da trotz des gegenteiligen Befundes von Liebermann und Fenyvessy manche Autoren daran festzuhalten scheinen, daß die in Rede stehenden Immunkörper eiweißartiger Natur sind, war es von Wichtigkeit, zu entscheiden, ob die nach der Methode von Liebermann und Fenyvessy mit Salzsäure

extrahierte und auf die oben geschilderte Weise gereinigte wirksame Trockensubstanz tatsächlich eiweißfrei ist oder nicht.

Zu diesem Zwecke habe ich die üblichen Eiweißreaktionen mit gewogenen Mengen Trockensubstanz ausgeführt und zur Kontrolle mit ebensoviel oder kleineren Mengen Serumglobulins, welche kleine Mengen Serumglobulin mit den angewendeten Reagenzien immer ein positives Resultat ergaben. Ich habe die folgenden Eiweißreaktionen vorgenommen:

Mit 9,2 mg Trockensubstanz die Biuretreaktion
„ 5,4 „ „ „ Millonsche Reaktion
„ 9,6 „ „ „ Xanthoprotein-Reaktion
„ 4,8 „ „ „ Adamkiewiczsche „

Sämtliche Reaktionen ergaben ein negatives Resultat. Außer diesen habe ich noch Eiweißreaktionen in der kochsalzhaltigen Lösung des Materials vorgenommen, welche Lösung in jedem Kubikzentimeter 3,4 mg Trockensubstanz enthielt. Die darin vorgenommene Sulfosalicylsäure- und Xanthoprotein-Reaktionen ergaben wieder ein völlig negatives Resultat.

Alle diese Reaktionen, sowie die Abwesenheit von bleischwärzendem Schwefel beweisen, daß das auf diese Weise isolierte Material kein Eiweißkörper ist.

Zur Entscheidung dessen, ob das die oben geschilderten chemischen Eigenschaften besitzende Material die Immunkörper tatsächlich enthält, habe ich Agglutinations- und hämolytische Proben angestellt. Ich habe eine Lösung (in physiologischer NaCl-Lösung) hergestellt, die in jedem Kubikzentimeter 3,07 mg Trockensubstanz enthielt. 1 ccm dieser Lösung wurde mit 5 Tropfen $10^0/_0$iger Schweineblutkörperchenemulsion vermengt. Agglutination konnte prompt beobachtet werden, und nach 2stündigem Aufenthalt im Brutschrank war die Agglutination stark. Dieses Verfahren hatte aber die Agglutininmenge der Lösung noch nicht erschöpft, denn nach Zentrifugieren der agglutinierten Mengen gab ich zu der Lösung wieder 5 Tropfen Blutkörperchenemulsion und erhielt abermals und auch sofort bemerkliche und nach 2stündigem Aufenthalt im Brutschrank stark gewordene Agglutination. Dieser Agglutinationsversuch wurde 2mal mit aus verschiedenen Teilen der Trockensubstanz entnommenen Proben wiederholt, immer mit demselben Resultat.

Bei der hämolytischen Probe wurde 1 ccm Lösung mit 5 Tropfen 10% Schweineblutkörperchenemulsion und als Komplement mit 1 Tropfen 6fach verdünntem frischen Meerschweinchenserum vermengt und 3 Stunden lang im Brutschrank gehalten. Die Hämolyse war zwar bemerkbar, aber gering. Das soll vielleicht bedeuten, daß die hämolytischen Immunkörper empfindlicher sind als die Agglutinine und unter dem langwierigen Reinigungsprozeß größtenteils zugrunde gehen.

Aus den hier mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß es mir gelang, nach der Methode von Liebermann und Fenyvessy aus den Seris gegen Schweineblutkörperchen immunisierter Kaninchen die entsprechenden Immunkörper zu isolieren, und die chemischen Untersuchungen zeigten, daß diese — auch nach der Isolierung wirksame — Immunkörper in Übereinstimmung mit den Angaben von Liebermann und Fenyvessy keine Eiweißkörper sind, da sie weder bleischwärzenden Schwefel enthalten, noch die bekannten empfindlichen Eiweißreaktionen geben. Ihr Stickstoffgehalt steht aber demjenigen der Eiweißkörper nahe.

Bezüglich des großen Aschengehalts des Materials und über seine Bedeutung wäre es verfrüht, sich zu äußern. Es ist möglich, daß es nur einfache Verunreinigung ist und daß man bei Verarbeitung größerer Mengen Materials und häufiger Reinigung zu ascheärmeren Produkten gelangen könnte. Ebenso kann vielleicht der Eisen- und Phosphorsäuregehalt aus den Blutkörperchen herrühren, von denen die Substanz abgespaltet wurde.

Über Resistenz der roten Blutkörperchen bei Stickstoffdefizit und bei Inanition.

Von

D. Acél.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 15. April 1919.)

Physiologische Versuche an Menschen und Tieren haben es längst erwiesen, daß das Nahrungseiweiß nur bis zu einer bestimmten Grenze durch sonstige Nährstoffe ersetzt werden kann, d. h. daß zur Erhaltung des Lebens ein bestimmtes Minimum an Eiweißnahrung unbedingt erforderlich ist. Wenn auch die Werte, die von den verschiedenen Autoren für den minimalen Eiweißbedarf des Menschen ermittelt worden sind, sehr weit voneinander abweichen, so wird doch allgemein angenommen, daß eine weitere Verminderung der Eiweißzufuhr zu Schädigungen des Organismus führen muß. Es wäre daher für das Studium der Frage sehr wichtig, wenn wir über ein empfindliches und sicheres Zeichen verfügen würden, das die infolge von Eiweißmangel eintretenden Schädigungen des Organismus erkennen lassen würde.

Es ist bekannt, daß der Organismus auf verschiedenartige Schädigungen mit bestimmten Reaktionen antwortet. An diesen Reaktionen müssen sich natürlich gewisse zellige Elemente beteiligen. Es wäre somit naheliegend, anzunehmen, daß die roten Blutkörperchen ebenfalls gewisse Veränderungen erfahren, wenn die notwendigen Bausteine des Körpers, also in erster Reihe die Eiweißkörper, in ungenügender Menge zugeführt werden, um so mehr, da es ja durch verschiedene Versuche und klinische Verfahren bekannt ist, daß die Erythrocyten

auf verschiedene Schädigungen des Organismus recht empfindlich reagieren.

Es war daher von Interesse, nachzuforschen, ob zwischen Eiweißmangel einerseits und zwischen dem Verhalten der roten Blutkörperchen anderseits Beziehungen existieren, und wenn ja, ob diese geeignet sind, aus dem Verhalten der Erythrocyten auf die Bedeutung des Eiweißhungers für den Gesamtorganismus bestimmte Schlüsse zu ziehen.

Es hat schon Chittenden[1]) bei seinen Versuchen über das Eiweißminimum die Zahl der Erythrocyten und den Hämoglobingehalt des Blutes verfolgt, ohne jedoch zu bestimmten Schlüssen zu gelangen.

Albertoni und Rossi[2]) haben in Menschenversuchen eine Zunahme des Hämoglobingehaltes gefunden, wenn die Versuchspersonen nach einer minimalen Zufuhr von Pflanzeneiweiß einen Zusatz von Fleisch oder Eiern erhalten haben. Wir möchten aber schon hier bemerken, daß es kaum angeht, in diesen Fällen die Hämoglobinzunahme auf die Vermehrung der Eiweißnahrung zurückzuführen.

Aus diesen sowie aus den weiter unten zu besprechenden Versuchen geht nur so viel hervor, daß weder die Blutkörperchenzahl, noch der Hämoglobingehalt des Blutes ein Indicator der durch Änderungen der Eiweißzufuhr im Organismus hervorgerufenen Schädigungen abgeben können.

Es ist neuerdings wiederholt gezeigt worden, daß die Resistenz der Blutkörperchen gegen verschiedene Einwirkungen bei gewissen Erkrankungen Änderungen erfährt, die für die betreffende Krankheit charakteristisch sein kann. Es war daher mehr Erfolg zu erwarten, wenn der Einfluß des Eiweißhungers an der Resistenz der Erythrocyten geprüft wird.

Wir haben in unseren Untersuchungen die Resistenz der roten Blutkörperchen mit dem von Liebermann[3]) angegebenen Verfahren bestimmt. Bezüglich der Einzelheiten dieser Methode sei auf die Originalmitteilung verwiesen und an dieser Stelle nur so viel erwähnt, als es zur Klarheit der nachstehenden Bemerkungen notwendig ist.

Mit der Liebermannschen Methode wird jener Anteil der roten Blutkörperchen angegeben, der bei einer bestimmten

---

[1]) Chittenden, zit. Oppenheimer, Handb. d. Biochemie 4, I. Teil, 790.

[2]) Albertoni und Rossi, ebenda.

[3]) L. von Liebermann, Deutsche med. Wochenschr. 1912, 462.

Konzentration und Menge einer Kochsalzlösung bei einer bestimmten Versuchszeit in Lösung geht. Das Resultat wird durch einen Quotienten (RQ = Resistenzquotient) ausgedrückt, der das Verhältnis der resistenten (nicht aufgelösten) Blutkörperchen zu den nicht resistenten (aufgelösten) für eine bestimmte Kochsalzkonzentration angibt. Heißt es z. B. $RQ_{0,5} = 1$, so bedeutet das, daß in einer 0,5 %igen Kochsalzlösung die Zahl der resistenten und nicht resistenten Blutkörperchen die gleiche war, was einer Resistenz von 50 % entspricht. $RQ_{0,5} = \infty$ bedeutet, daß in einer 0,5 %igen Kochsalzlösung sämtliche Erytrocythen ungelöst bleiben, während $RQ_{0,5} = 0$ vollständige Hämolyse zum Ausdruck bringt (im ersteren Falle ist die Resistenz 100 %, im letzteren 0 %).

Die Versuche, über die hier zunächst berichtet werden soll, sind an Hunden, die späteren an Mäusen und Meerschweinchen ausgeführt worden.

Versuch 1.

Hund von 6250 g Gewicht. Der Versuch dauerte 76 Tage; während dieser Zeit wurde sowohl Nahrungsstickstoff, als auch der mit Kot und Harn ausgeschiedene Stickstoff täglich bestimmt. Der Versuch beginnt mit einer Periode von N. plus und geht allmählich in Perioden von Stickstoffverlust über. Das entzogene Eiweiß wurde mit Kohlenhydrat und Fett ersetzt, so daß die Energiezufuhr stets die gleiche war. Die Blutkörperchenresistenz wurde für 0,5 sowie für 0,45 %ige Kochsalzlösung bestimmt.

In diesem Versuche ließen sich bestimmte regelmäßige Beziehungen zwischen dem Verhalten des N-Stoffwechsels und der Resistenz der roten Blutkörperchen nicht nachweisen, weshalb wir sowohl hier als bei einem zweiten Versuch auf die Mitteilung der Versuchsdaten verzichten und nur so viel bemerken, daß es bei dem zweiten Versuch anfangs den Anschein hatte, als wenn bei N-Minus eine gewisse Resistenzerhöhung stattgefunden hätte, dieselbe verschwand aber in der nächsten Periode.

Versuch 3.

Ein dritter Hund wurde mit dem Zwecke eingestellt, den zweiten Versuch zu wiederholen. Ein Zufall verhinderte aber diesen Plan und leitete die Untersuchungen in andere Bahnen.

Tabelle I.

Datum	Gewicht	Tägliche Nahrung: Menge	Tägliche Nahrung: N-Gehalt g	N-Ausgabe: Harn g	N-Ausgabe: Kot g	N-Ausgabe: Zusammen g	N-Bilanz g	RQ 0,5	RQ 0,45	Hämoglobin (Sahli)	Anmerkungen
21. 6.	11,750	50 g Fleischpulver	38,59	29,784	1,276	31,06	+ 7,53	—	—	—	Abgrenzung
23. 6.	11,900	150 g Grieß . . .						∞	0,705	140	
25. 6.	12,100	25 g Zucker . . .						∞	0,6	165	Hat nur 1/3 der Nahrung genommen
26. 6.	11,800	25 g Stärke . . .						—	—	—	Abgrenzung
27. 6.	11,400		16,11	140,3	1,8	142,1	— 126,01	—	—	—	Abgrenzung
28. 6.	11,400							∞	0,2	153	Hat nur 1/2 der Nahrung genommen
30. 6.	11,200	50 g Grieß . . .						∞	0,235	153	
2. 7.	11,200	75 g Stärke . . .						∞	5,0	160	
5. 7.	10.900	75 g Zucker . . .						∞	1,25	160	
7. 7.	10,600	20 g Fett						∞	2,62	160	
9. 7.	10,400							∞	2,75	155	Frißt kaum
11. 7.	10,300							∞	1,37	160	„ „
14. 7.	9,900							∞	1,25	155	„ „ Abgrenzung
16. 7.	10,600	50 g Fleischpulver	35,56	23,846	1,166	25,012	+ 10,552	∞	2,0	165	
18. 7.	10,700	150 g Grieß . . .						∞	1,25	165	Abgrenzung
21. 7.	10,800	25 g Zucker . .						∞	1,83	163	Kot sehr flüssig
24. 7.	10,800	25 g Stärke . . .						∞	3,0	165	

Wie aus der Tabelle I ersichtlich, hat das Tier vom 25. 6. ab nur die Hälfte oder ein Drittel, bzw. einen noch geringeren Teil der gereichten Nahrung aufgenommen. Infolgedessen geriet es nicht nur in Stickstoff-, sondern auch in Caloriendefizit. Nun sehen wir in der Rubrik $RQ_{0,45}$ (die Werte $RQ_{0,5}$ sind durchweg unbrauchbar), daß die Resistenz der Blutkörperchen bei Stickstoff- und gleichzeitigem Energiedefizit eine deutliche Steigerung erfährt. Solange die Energiezufuhr eine genügende war, erwiesen sich in einer 0,45 %igen Kochsalzlösung 37,5 %, bzw. 41,17 % der Erythrocyten als resistent, während bei ungenügender Energiezufuhr, die Resistenz von 2 Fällen abgesehen, zwischen 55,5 und 83,3 % schwankt. Die folgende Periode mit positiver Bilanz konnte nicht weiter fortgesetzt werden infolge eines Darmkatarrhs des Tieres, der am 5. Tage zum Vorschein kam. Infolgedessen lassen sich diese Daten nicht verwerten.

In diesem Versuche ist auch der Hämoglobingehalt des Blutes bestimmt worden, und zwar mit dem Sahlischen Hämometer. Die Schwankungen, die hier beobachtet wurden, sind nicht sehr erheblich und lassen keine Beziehungen zu den Stoffwechseländerungen erkennen. Wir können somit die oben erwähnten Beobachtungen von Chittenden, daß Verminderung der Eiweißzufuhr keinen Einfluß auf den Hämoglobingehalt hat, bestätigen.

Der Einfluß einer calorisch ungenügenden Nahrung auf die Resistenz der Erythrocyten, der sich in einer Erhöhung derselben kundgibt, war in dem obigen Versuch so auffallend, daß es uns notwendig schien, diese Verhältnisse durch weitere direkte Versuche aufzuklären. In diesen kam es uns also darauf an, den Einfluß der Nahrungsentziehung möglichst deutlich zur Geltung kommen zu lassen. Daher haben wir die Tiere nach einer Periode von normaler Ernährung einige Zeit hungern lassen. Wir haben die Versuche zunächst an weißen Mäusen ausgeführt. In den Vorversuchen wurde zunächst die für die Resistenzbestimmung geeignete Kochsalzkonzentration ermittelt. Diese wurde 0,55 % gefunden. Vor dem eigentlichen Versuche wurde bei demselben Tier die Resistenz wiederholt bestimmt. Die hierzu nötige geringe Blut-

menge wurde aus dem Schwanz genommen. Es wurden zunächst zwei Mäuse herangezogen. Sie erhielten vom zweiten Tage an keine Nahrung, hingegen Wasser in beliebiger Menge. Die Resultate sind in der Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

	Weiße Maus Nr. 1				Weiße Maus Nr. 2			
Datum	Gewicht g	RQ 0,55	RQ in %	Anmerkung		Gewicht g	RQ 0,55	RQ in %
14. 9.	16,7	0,867	46,43	—	—	12,05	0,842	45,71
15. 9.	—	0,6	37,5	Hungert von nachmittag 6 Uhr an		—	0,9	47,95
16. 9.	—	1,38	57,98	—	—	—	1,38	57,98
17. 9.	14,2	2,16	68,35	—	—	9,0	2,0	66,0
18. 9.	13,1	Nahe ∞	Nahe 100	—	—	8,3	Nahe ∞	Nahe 100
19. 9.	11,7	∞	100	Exit nachm. 4 Uhr	Exit vm. 10 Uhr	8,1	—	—

Die beiden Tiere sind nach 4 Tagen des Hungerns eingegangen. Während dieser Zeit verlor die Maus 1, 30 %, die Maus 2, 33 % ihres Gewichtes. In beiden Fällen ist die Zunahme der Erythrocytenresistenz sehr deutlich. Sie beginnt bereits 24 Stunden nach der Entziehung der Nahrung und steigt weiter an. So erwiesen sich bei der Maus 1 zur Zeit der normalen Ernährung 46, bzw. 37 %, am 4. Hungertage aber 100 % der Erythrocyten als resistent. Ganz ähnlich verhielt sich die Maus 2, die 6 Stunden vor der 1. Maus verendete.

Es hat sich also die an dem letzten Hundeversuch gemachte Beobachtung, d. h. die Erhöhung der Erythrocytenresistenz bei Nahrungsentziehung durch diese beiden Mäuseversuche bestätigen lassen. Es war nur noch ein Kontrollversuch notwendig, um den evtl. Einfluß der wiederholten Blutentnahme auf die Resistenz der Blutkörperchen bewerten zu können. Es wurden zu diesem Zwecke 2 Mäuse eingestellt, die eine bei normaler Ernährung, die andere ohne Nahrung, und es wurden beiden von Zeit zu Zeit möglichst gleiche Blutmengen entnommen. Das Resultat dieser Versuche ist aus Tabelle III ersichtlich,

Tabelle III.

Datum	Hungernde Maus				Kontrollmaus		
	Gewicht g	RQ 0,55	RQ in %	Anmerkung	Gewicht g	RQ 0,55	RQ in %
20. 9.	14,2	2,0	66,0	Hungert von mittag 12 Uhr an	14,08	1,5	60,0
21. 9.	14,35	2,0	66,0		15,0	1,8	64,28
22. 9.	11,55	2,5	71,42	—	15,3	1,55	60,78
22. 9. nachm. ½5 Uhr	—	4,0	80,0	—	—	1,33	57,08
22. 9. abends 8 Uhr	—	5,0	83,3	—	—	2,0	66,0
23. 9. vorm. 10 Uhr	11,0	Nahe ∞	Nahe 100	Exit vormittags 10½ Uhr	15,1	1,7	62,96

In diesem Versuch weist das hungernde Tier dieselbe Resistenzerhöhung auf (von 66 % auf nahezu 100 %), die wir in Tabelle II gesehen haben, während das Kontrolltier ganz unbedeutende Schwankungen zeigt (von 57 bis 66 %). Somit spielt die Blutentnahme bei der beobachteten erhöhten Blutkörperchenresistenz keine Rolle. Sie ist vielmehr lediglich auf die Karenz zurückzuführen. Zu bemerken ist übrigens, daß die eigentliche Versuchsmaus nur 2 Tage gehungert und etwa 22 % ihres Gewichtes verloren hat.

Es wurde sodann ein Hungerversuch an einem Meerschweinchen und ein entsprechender Kontrollversuch bei normaler Nahrung ausgeführt. Die Erythrocytenresistenz wurde für eine 0,4 %ige Kochsalzlösung bestimmt. Gleichzeitig wurde auch der Hämoglobingehalt nach der Sahlischen Methode festgestellt.

Wir ersehen also aus der Tabelle IV, daß die Resistenz der Meerschweinchen-Erythrocyten bei dem eigentlichen Versuchstier zur Zeit der normalen Ernährung (in den ersten 5 Versuchstagen) nur unbedeutende Schwankungen zeigt (von 16,6 bis 22,1 %). In den ersten beiden Tagen der Hungerperiode sinkt zunächst die Resistenz, um vom 3. Tage an stetig zuzunehmen bis zu 41,86 %. Es ist somit die Zahl der re-

Tabelle IV.

	Hungerndes Meerschweinchen					Kontrollmeerschweinchen			
Datum	Gewicht g	RQ 0,4	RQ in %	Hb. (nach Sahli)	Anmerkung	Gewicht g	RQ 0,4	RQ in %	Hb. (nach Sahli)
29. 9.	455	0,2	16,6	128		420	0,16	13,7	129
30. 9.	460	0,285	22,1	126		425	0,33	24,81	131
2. 10.	465	0,2	16,6	123		435	0,38	27,53	129
4. 10.	470	0,23	18,7	122		448	0,22	18,03	133
6. 10.	470	0,2	16,6	128	Hungert von mittag 12 Uhr an	450	0,18	15,25	130
7. 10.	435	0,16	13,7	132		445	0,18	15,25	130
8. 10.	400	0,14	12,28	133		450	0,125	11,1	129
9. 10.	375	0,32	24,24	138		450	0,2	16,6	127
10. 10.	365	0,72	41,86	140	Sehr hinfällig. Starker Haarausfall	470	0,18	15,25	130
11. 10.	355	0,7	41,17	160	desgl.	460	0,3	23,07	125
12. 10.	310	0,7	41,17	165	Exit vorm. 11 Uhr	460	0,14	12,2	124

sistenten Blutkörperchen auf das Doppelte gestiegen. Während dieser Zeit hat das Tier 32 % seines Gewichtes verloren.

Beim Kontrolltier, das also normal ernährt wurde und dem von Zeit zu Zeit die gleichen Blutmengen entnommen wurden, schwankt die Resistenz ohne bestimmte Regelmäßigkeit zwischen 11,1 % und 27,5 %.

Bei dem Kontrolltier ist der Hämoglobingehalt des Blutes annähernd konstant. Beim Hungertier sehen wir eine fortschreitende Zunahme des Hämoglobingehaltes bis zum Tode, doch möchten wir diesen Befund einfach auf die durch Wasserverlust bedingte Konzentration des Blutes zurückführen.

Es ist uns somit auch an Meerschweinchen gelungen, die im letzten Hundeversuch sowie in den Mäuseversuchen beobachtete Steigerung der Erythrocytenresistenz durch Nahrungsentziehung zu konstatieren.

Zusammenfassung.

Überblicken wir die mitgeteilten Versuche, so sehen wir zunächst aus den beiden ersten Hundeversuchen, daß eine ungenügende Stickstoffzufuhr (negative Stickstoffbilanz) keinen merkbaren und gesetzmäßigen Einfluß auf die Resistenz der Erythrocyten ausübt. Aus den Versuchen Nr. 1, 2 und 3

geht aber hervor, daß eine calorisch ungenügende Ernährung bzw. vollständige Nahrungsentziehung eine sehr deutliche Wirkung auf die roten Blutkörperchen hat, die sich bei allen von uns untersuchten Tierarten (Hund, Maus, Meerschweinchen) in demselben Sinne äußert. Wir möchten daher die Resultate unserer Untersuchungen wie folgt zusammenfassen:

1. Eine ungenügende Stickstoffzufuhr allein bei angemessener, calorisch genügender Nahrung hat auf die Resistenz der Erythrocyten keinen, wenigstens keinen durch die von uns angewendete Methode nachweisbaren Einfluß.

2. Bei calorisch ungenügender Ernährung bzw. bei fortgesetztem Hungern nimmt die Resistenz der Blutkörperchen deutlich zu.

Beitrag zur Lehre von der Blutgerinnung.

Von

Karl Schilling.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 19. April 1919.)

Der Verlauf und Vorgang der Blutgerinnung hat von jeher das regste Interesse der Biologen auf sich gezogen. Viele experimentelle Untersuchungen wurden zur Ergründung der Ursache und des Ablaufes derselben angestellt; darunter die ausführlichen und grundlegenden Arbeiten von Loeb, Conradi, Morawitz u. a.

Hierdurch wurde unzweideutig festgelegt, daß durch den Gehalt, die Bildung und die Zusetzung bestimmter Substanzen die Gerinnungsfähigkeit des Blutes beschleunigt, herabgesetzt oder völlig aufgehoben werden kann. Als solche kommen in Frage: die Kalksalze, die Kinase, sowie eine größere Anzahl anorganischer und organischer Stoffe.

Weiterhin haben in eingehenden Mitteilungen Stuber und Heim gezeigt, daß die beschleunigende Wirkung der Organextrakte auf die Blutgerinnung als eine Folge ihres Lipase- und Fettgehaltes aufzufassen ist. Ihre mit Pferdeoxalatplasma und am lebenden Tiere durchgeführten Versuche fanden in einer weiteren Arbeit von Stuber und Partsch, die den Gerinnungsvorgang an mit Petroläther entfettetem Plasma prüften, eine weitere Stütze und bestätigten so die Angaben von Bordet-Delange und Zak, nach denen entfettetes Plasma sein Gerinnungsvermögen verliert und durch Zusatz lipoidartiger Substanzen dasselbe wiedergewinnt. Stuber sieht in dem Fettsäureradikal die eigentliche Ursache der Gerinnungsbeschleunigung.

Eine „Studien zur Chemie und Physiologie der Blutgerinnung, III" betitelte Abhandlung von Herzfeld und Klinger, nach der entgegen den Ausführungen von Stuber und Heim den höheren Fettsäuren ein spezifischer Einfluß auf die Blut-

gerinnung abgesprochen wird, und die Lipoide als keineswegs unerläßlich für die Gerinnung bezeichnet werden, veranlaßte mich auf Anregung von Stuber ihre Arbeiten und die von Herzfeld und Klinger, soweit sie Organe und Organextrakte anlangten, nochmals einer eingehenden Prüfung zu unterziehen.

Ähnliche Untersuchungen wurden von Yamada mit acetonextrahiertem Knochenmark und den dabei erhaltenen Acetonlipoiden angestellt. Doch kam genannter Autor zu negativen Ergebnissen. Nun muß aber gegen die Arbeit Yamadas ein Einwand erhoben werden. Die Wahl des Extraktionsmittels ist für eine quantitative Fettextraktion keineswegs gleichgültig. Es sei in dieser Hinsicht nur auf die Arbeiten von Erlandsen, Kumagawa-Suto und Ivar Bang verwiesen. Yamada selbst weist auch in seiner Arbeit darauf hin, daß er nur aus Mangel an Petroläther Aceton zur Extraktion verwandt habe. Aceton steht aber bezüglich seines Fettextraktionsvermögens gegen den Petroläther weit zurück, so daß auf diese Weise zubereitete Organe keineswegs als fettfrei angesehen werden können. Außerdem reicht auch die Prozedur des einfachen Schüttelns nicht aus, um eine ausgiebige Extraktion zu erzielen. Die in Yamadas Versuchen aufgetretene Gerinnungsbeschleunigung nach Zusatz der „entfetteten" Organe dürfte dementsprechend durch die ungenügende Extraktion zu erklären sein.

Im folgenden wird der 1. Teil der Versuche in extenso wiedergegeben.

Methodik.

1. Zubereitung der frischen Organextrakte.

Die frischen Organe Leber, Lunge, Herz, Niere, Nebennieren, Hoden, Thymus und Milz wurden von Kaninchen, Hypophyse vom Pferd, Pankreas vom Rind und Schilddrüse vom Hammel gewonnen. Kaninchen wurden nach Freilegung der Halsgefäße in Äthernarkose verbluten lassen. Durch die Vena jugularis wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (ca. $1^1/_2$ l) bis zum Herzstillstand nachgespült, um die Organe möglichst blutfrei zu erhalten. Die Organe wurden dann nach Befreiung vom Bindegewebe und anhaftenden Fett stark zerkleinert, eine entsprechende Menge Wasser zugesetzt und ca. 1 Stunde auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Nachdem sich die festen Bestandteile beim Stehen zu Boden gesetzt haben, wird der darüber stehende Extrakt abgegossen und zu den in folgendem wiedergegebenen Versuchen verwandt.

2. Zubereitung der getrockneten und extrahierten Organe.

Da uns nur in beschränktem Maße Petroläther und Alkohol zur Verfügung standen, wurden nur 4 Organe: Leber, Lunge, Herz und Niere zur Extraktion verwandt. Die Organe wurden vom Kaninchen in der oben genannten Weise entnommen; gut zerkleinert und durch ein feines Drahtsieb gequetscht. Dann nach Angabe von Wiechowski auf paraffinierten Glasplatten in dünner Schicht ausgestrichen und im Exsiccator unter Luftdurchleitung getrocknet. Es ist wichtig, daß das Trocknen in möglichst kurzer Zeit geschieht, da sich die Organe rasch verändern und, wie eigene Versuche gezeigt haben, zu ganz falschen Resultaten führen. Die eingetrocknete Masse, die sich von den Platten glatt ablöst, wird in der Reibschale möglichst fein pulverisiert und ein Teil davon im Soxhlet-Apparat 6 Tage mit Petroläther und 3 Tage mit 92 $^0/_0$ igem Alkohol extrahiert. Der fettreiche Organrückstand wird bis zum Verschwinden der Alkoholdämpfe getrocknet und in destilliertem Wasser aufgenommen. Der zweite, nicht entfettete Teil wird direkt in destilliertes Wasser aufgeschwemmt. Alle die Aufschwemmungen (Emulsionen), die extrahierten und nicht extrahierten, werden in 1 $^0/_0$ iger Lösung hergestellt, einige Zeit kräftig geschüttelt und bis zum Absitzen der ungelösten Bestandteile stehen gelassen (ca. 2 Stunden). Zu den Versuchen wurden dann die beinahe klaren Emulsionen verwandt.

3. Zubereitung der Fettrückstände.

Die Fettrückstände — in Petroläther und Alkohol — wurden bis zu einem kleinen Restrückstand eingedampft; letzterer in angewärmtem absoluten Alkohol aufgenommen und in 20 ccm mäßig stark erwärmtes destilliertes Wasser tropfenweise unter starkem Umschütteln eingegossen, damit möglichst homogene Emulsionen entstanden. Auf dem Wasserbade wurde dann dieses Gemisch so lange eingedampft, bis keine Spur des Petroläthers und Alkohols mehr nachzuweisen war. Das mitverdampfte Wasser wurde wieder auf 20 ccm ergänzt. Bei späteren Versuchen wurde außer absolutem Alkohol noch in gleichen Mengen Aceton zugegeben, um klarere Emulsionen zu erhalten. Die Resultate waren genau dieselben.

4. Plasma.

a) Zu allen Versuchen wurde 2 $^0/_{00}$iges Pferdeoxalatplasma verwandt, das aus der Arterie direkt in Natr. oxalat.-Lösung aufgefangen wurde und den Vorteil hat, daß sich schon nach kurzer Zeit die zelligen Elemente sedimentiert haben.

b) Ein Teil des Plasmas wurde 36 Stunden im Embden-Lindeschen Apparat mit Petroläther extrahiert. Der Petroläther wurde dann durch Luftdurchleiten entfernt und das Plasma möglichst bald zu den Gerinnungsversuchen verwandt.

5. Reagensgläschen.

Da die Gerinnungszeit von der Beschaffenheit des Glases und auch der Weite des Röhrchens beeinflußt wird, wurde mit möglichst gleichweiten, vollkommen entfetteten und getrockneten Reagensgläschen experimentiert.

6. Gerinnungszeit und Intensität.

In allen Tabellen ist die Gerinnungszeit in Minuten, die Gerinnungsintensität für klumpig +, als unvollständig geronnen als ++ und vollständig geronnen als +++ angegeben. Bei vollständiger Gerinnung erstarrt die Masse, ist gelatinös und haftet beim Umdrehen des Glases fest an diesem an. Bei unvollständig löst sich die gelatinöse Masse noch vom Glase ab, und bei klumpig geht die Masse vom flockigen in den gelatinösen Zustand über.

7. Versuchsanordnung.

Es wurde zu allen Versuchen 2 ccm Pferdeoxalatplasma verwandt und in entsprechenden Mengen frische Organextrakte, Organemulsionen und Fettrückstände zugesetzt und diese Gemische $^1/_2$ Stunde im Brutschrank bei 37^0 erwärmt. Dann wurden 3 Tropfen einer 5 $^0/_0$igen Calciumchloridlösung zugesetzt, rasch umgeschüttelt und der Gerinnungsvorgang beobachtet.

8. Von den zahlreichen Versuchen, die immer wieder das gleiche Resultat ergaben, wurde jedesmal nur einer als Beispiel angeführt.

Versuche.

1. Versuche mit nativem Pferdeoxalatplasma und frischen Organextrakten.

In einer Reihe von Reagensgläschen werden je 2 ccm Plasma und je 2, 3, 5, 10, 20 und 30 Tropfen der verschiedenen Organextrakte eingefüllt. Als Kontrollen werden entsprechende Mengen einer 1%igen Tierkohleaufschwemmung und destilliertes Wasser beigefügt. Nach ½stündiger Erwärmung der Gemische im Brutschrank bei 37° werden je 3 Tropfen der 5%igen Calciumchloridlösung zugesetzt, und dann wird durch vorsichtiges Neigen der Reagensgläschen geprüft, in welchen es nur bis zum Klumpigwerden, in welchen es bis zur unvollständigen und vollständigen Gerinnung gekommen war; endlich in welchen das Plasma ganz flüssig geblieben ist. Die Versuche ergaben folgendes.

Tabelle I.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 2 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	10
2	2	Lunge	3	—	2	3
3	2	Herz	3	—	9	11
4	2	Niere	3	—	4	6
5	2	Nebenniere	3	6	7	8
6	2	Thymus	3	—	3	4
7	2	Hoden	3	—	3	3½
8	2	Milz	3	21	24	27
9	2	Hypophyse	3	—	—	½
10	2	Schilddrüse	3	—	—	2
11	2	Pankreas	3	—	—	1
12	2	Tierkohle	3	20	24	27
13	2	H_2O	3	21	24	27

Tabelle II.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 3 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	10½
2	2	Lunge	3	—	—	2½
3	2	Herz	3	—	7	8
4	2	Niere	3	—	4	5½
5	2	Nebenniere	3	—	5½	8
6	2	Thymus	3	—	—	2½
7	2	Hoden	3	—	—	2½
8	2	Milz	3	14	18	20
9	2	Hypophyse	3	—	—	½
10	2	Schilddrüse	3	—	—	2
11	2	Pankreas	3	—	—	1
12	2	Tierkohle	3	—	14	16
13	2	H_2O	3	—	15	20

Tabelle III.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 5 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	4	5
2	2	Lunge	3	—		1
3	2	Herz	3	—	5	$5^1/_2$
4	2	Niere	3	·	3	$3^1/_2$
5	2	Nebenniere	3	—	4	4
6	2	Thymus	3	—	1	2
7	2	Hoden	3	—	1	2
8	2	Milz	3	—	6	$7^1/_2$
9	2	Hypophyse	3	—		$^1/_2$
10	2	Schilddrüse	3	—		$^1/_2$
11	2	Pankreas	3	—		1
12	2	Tierkohle	3	—	7	9
13	2	H_2O	3	—	7	9

Tabelle IV.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 10 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	$3^1/_2$
2	2	Lunge	3	—	—	$^3/_4$
3	2	Herz	3	—	—	$4^1/_2$
4	2	Niere	3	—	$2^1/_2$	3
5	2	Nebenniere	3	—	—	$3^1/_2$
6	2	Thymus	3	—	—	1
7	2	Hoden	3	—	—	1
8	2	Milz	3	6	$7^1/_2$	8
9	2	Hypophyse	3	—	—	$^1/_2$
10	2	Schilddrüse	3	—	—	$^1/_2$
11	2	Pankreas	3	—	—	1
12	2	Tierkohle	3	—	$6^1/_2$	8
13	2	H_2O	3	—	7	8

Tabelle V.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 20 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	$1^1/_2$
2	2	Lunge	3	—	—	$^1/_2$
3	2	Herz	3	—	—	1
4	2	Niere	3	—	—	$^1/_2$
5	2	Nebenniere	3	—	—	1
6	2	Thymus	3	—	—	$^1/_2$
7	2	Hoden	3	—	—	$^1/_2$
8	2	Milz	3	$2^1/_2$	$3^1/_2$	$4^1/_2$
9	2	Hypophyse	3	—	—	$^1/_4$
10	2	Schilddrüse	3	—	—	$^1/_2$
11	2	Pankreas	3	—	—	$^1/_2$
12	2	Tierkohle	3	—	—	$5^1/_4$
13	2	H_2O	3	—	—	$5^1/_2$

Tabelle VI.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 30 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	1	1 1/2
2	2	Lunge	3	—	—	1/4
3	2	Herz	3	—	—	1
4	2	Niere	3	—	—	1/4
5	2	Nebenniere	3	—	—	1
6	2	Thymus	3	—	—	1/2
7	2	Hoden	3	—	—	1/2
8	2	Milz	3	—	3 1/2	4
9	2	Hypophyse	3	—	—	1/4
10	2	Schilddrüse	3	—	—	1/2
11	2	Pankreas	3	—	—	1/2
12	2	Tierkohle	3	—	—	4 1/2
13	2	H_2O	3	—	—	5

Resultat: Aus den Versuchen geht hervor, daß vor allen Dingen Lunge, Niere, Thymus, Hoden, Hypophyse, Schilddrüse und Pankreas eine stark beschleunigende Gerinnung hervorriefen. Doch gleichen sich die Unterschiede der Beschleunigung mehr aus — mit Ausnahme der Milz —, wenn die Extrakte in größeren Mengen beigegeben werden. Eines sei noch erwähnt: Der Wasserzusatz zu den einzelnen Organen erfolgte, soweit es möglich war, dem Organgewicht entsprechend, nur beim Pankreas wurde mehr Organmasse verwandt, was vielleicht eine gewisse Beschleunigung der Gerinnung zur Folge hatte.

2. Versuche mit extrahiertem Pferdeoxalatplasma und frischen Organextrakten.

In derselben Weise wie in den vorigen Tabellen wurden zum Plasma, daß 36 Stunden mit Petroläther extrahiert war, die Organextrakte zugesetzt.

Tabelle VII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 2 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	—
2	2	Lunge	3	107	—	—
3	2	Herz	3	—	—	—
4	2	Niere	3	—	—	—
5	2	Nebenniere	3	—	—	—
6	2	Thymus	3	107	—	—
7	2	Hoden	3	—	—	—
8	2	Milz	3	—	—	—
9	2	Hypophyse	3	—	—	—
10	2	Schilddrüse	3	—	—	—
11	2	Pankreas	3	—	—	—
12	2	Tierkohle	3	—	—	—
13	2	H_2O	3	—	—	—

Tabelle VIII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 3 Tropfen	5 % ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	—
2	2	Lunge	3	58	—	—
3	2	Herz	3	—	—	—
4	2	Niere	3	—	—	—
5	2	Nebenniere	3	—	—	—
6	2	Thymus	3	57	—	—
7	2	Hoden	3	—	—	—
8	2	Milz	3	—	—	—
9	2	Hypophyse	3	—	—	—
10	2	Schilddrüse	3	25	60	107
11	2	Pankreas	3	—	—	—
12	2	Tierkohle	3	—	—	—
13	2	H_2O	3	—	—	—

Tabelle IX.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 5 Tropfen	5 % ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	—
2	2	Lunge	3	16	36	56
3	2	Herz	3	58	—	—
4	2	Niere	3	21	49	—
5	2	Nebenniere	3	—	—	—
6	2	Thymus	3	16	34	56
7	2	Hoden	3	16	37	59
8	2	Milz	3	—	—	—
9	2	Hypophyse	3	109	—	—
10	2	Schilddrüse	3	7	9	21
11	2	Pankreas	3	—	—	—
12	2	Tierkohle	3	—	—	—
13	2	H_2O	3	—	—	—

Tabelle X.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 10 Tropfen	5 % ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	—
2	2	Lunge	3	6	7	11
3	2	Herz	3	—	—	—
4	2	Niere	3	9	10	17
5	2	Nebenniere	3	39	—	—
6	2	Thymus	3	5	6	6
7	2	Hoden	3	5	6	6
8	2	Milz	3	—	—	—
9	2	Hypophyse	3	2	3	4
10	2	Schilddrüse	3	2	3	4
11	2	Pankreas	3	—	—	—
12	2	Tierkohle	3	—	—	—
13	2	H_2O	3	—	—	—

Tabelle XI.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 20 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	2	4	5
2	2	Lunge	3	—	1	1
3	2	Herz	3	40	—	—
4	2	Niere	3	1	1½	2
5	2	Nebenniere	3	—	2	4
6	2	Thymus	3	—	1	1
7	2	Hoden	3	—	1	1
8	2	Milz	3	—	—	—
9	2	Hypophyse	3	—	—	1
10	2	Schilddrüse	3	—	1	2
11	2	Pankreas	3	—	—	—
12	2	Tierkohle	3	—	—	—
13	2	H_2O	3	—	—	—

Tabelle XII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Frische Organextrakte 30 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	2	2
2	2	Lunge	3	—	—	½
3	2	Herz	3	2	16	36
4	2	Niere	3	—	—	1
5	2	Nebenniere	3	—	—	2
6	2	Thymus	3	—	—	½
7	2	Hoden	3	—	—	½
8	2	Milz	3	—	—	—
9	2	Hypophyse	3	—	—	1
10	2	Schilddrüse	3	—	1	1½
11	2	Pankreas	3	—	—	—
12	2	Tierkohle	3	—	—	—
13	2	H_2O	3	—	—	—

Resultat: Das entfettete Plasma ergibt beim Zusatz von kleinen Mengen der Organextrakte keine Gerinnung. Erst bei Mengen von 5 Tropfen und mehr tritt eine Gerinnung ein, und da sind es vor allem wieder Lunge, Niere, Thymus, Hoden, Hypophyse und Schilddrüse. Die Kontrollen waren nach mehreren Stunden noch vollkommen flüssig. Da erst größere Mengen einen Einfluß auf die Gerinnung ausüben, liegt die Vermutung nahe, daß eben die dem Plasma entzogenen ätherlöslichen Produkte — Fette und Lipoide — wieder ausgeglichen werden müssen.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß bei der Entfettung des Plasmas äußerst sorgfältig zu verfahren ist. Vor allen Dingen sollte es nicht — wie es in den Arbeiten von Herzfeld und Klinger beschrieben wird — ausgeschüttelt werden. Auch darf im Embden-Lindeschen Ex-

traktionsapparat während des Extrahierens der Petroläther nicht direkt auf das Plasma gegossen, sondern muß stets in der Abflußflasche nachgefüllt werden, denn bei jeder starken und vor allen Dingen plötzlich mechanischen Einwirkung, wie z. B. Schütteln oder Aufgießen des Petroläthers direkt auf das Plasma, fällt gewöhnlich eine gallertartige, mucinähnliche Masse in großen Mengen aus, und das so veränderte Plasma ergibt bei derselben Versuchsanordnung durchaus abweichende, unrichtige Resultate. Wir vermuten, daß auf die Nichtbeachtung dieser Fehlerquelle die vielfach abweichenden Versuchsergebnisse einzelner Autoren zurückzuführen sind.

Aus was diese gallertartigen mucinähnlichen Massen bestehen, konnten wir bisher nicht genauer feststellen. Zum Teil handelt es sich jedenfalls um wasserlösliche Salze; es ist jedoch nicht unwahrscheinlich, daß auch Veränderungen der Eiweißstoffe dabei mitspielen.

3. Versuche mit nativem Pferdeoxalatplasma und Organemulsionen.

Die folgenden Versuche wurden mit den getrockneten, zerriebenen und dann in H_2O aufgenommenen Organen gemacht, und zwar sind zum besseren Vergleich die nicht extrahierten und die mit Petroläther und Alkohol extrahierten Organe (Emulsionen) nebeneinandergestellt.

Tabelle XIII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 2 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	6	16
2	2	Lunge	3	—	3	5
3	2	Herz	3	—	8	23
4	2	Niere	3	—	3	5
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	—	9	57
6	2	Lunge do.	3	—	12	63
7	2	Herz do.	3	—	6	31
8	2	Niere do.	3	—	8	47
9	2	Tierkohle	3	—	8 1/2	31
10	2	H_2O	3	—	22	62

Tabelle XIV.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 3 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	8	14
2	2	Lunge	3	—	—	2
3	2	Herz	3	—	2 1/2	17
4	2	Niere	3	—	2 1/2	3
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	—	9	30
6	2	Lunge do.	3	—	12 1/2	40
7	2	Herz do.	3	—	9	29
8	2	Niere do.	3	—	12 1/2	27
9	2	Tierkohle	3	—	12	41
10	2	H_2O	3	—	14	41

Tabelle XV.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 5 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	33
2	2	Lunge	3	—	—	4
3	2	Herz	3	—	—	36
4	2	Niere	3	—	—	2¼
5	2	Leber (extr.m. Petroläther u. Alkohol)	3	—	—	34
6	2	Lunge do.	3	—	—	62
7	2	Herz do.	3	—	—	40
8	2	Niere do.	3	—	—	34
9	2	Tierkohle	3	—	—	26
10	2	H_2O	3	—	—	40

Tabelle XVI.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 10 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	6	25
2	2	Lunge	3	—	—	3
3	2	Herz	3	—	6	26
4	2	Niere	3	—	—	1¾
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	—	7	38
6	2	Lunge do.	3	—	7	39½
7	2	Herz do.	3	—	7	25
8	2	Niere do.	3	—	7	28
9	2	Tierkohle	3	—	6½	21
10	2	H_2O	3	—	8	26

Resultat: Die nur getrockneten Organe ergaben eine deutliche Gerinnungsbeschleunigung gegenüber den extrahierten, die erst in derselben Zeit oder später als die beigefügten Kontrollen eine Gerinnung herbeiführten. Unter den Organen sind es auch hier wieder Lunge und Niere, die die Beschleunigung am deutlichsten zeigen.

Tabelle XVII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 2 Tropfen	5 % $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	17	45	180
2	2	Lunge	3	16	—	—
3	2	Herz	3	14	27	—
4	2	Niere	3	14	20	180
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	17	—	—
6	2	Lunge do.	3	14	27	—
7	2	Herz do.	3	14	—	—
8	2	Niere do.	3	14	27	—
9	2	Tierkohle	3	14	45	—
10	2	H_2O	3	17	I	—

Tabelle XVIII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 3 Tropfen	5% $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	17	44	—
2	2	Lunge	3	14	20	180
3	2	Herz	3	17	—	—
4	2	Niere	3	14	20	35
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	17	—	—
6	2	Lunge do.	3	14	36	—
7	2	Herz do.	3	18	—	—
8	2	Niere do.	3	18	180	—
9	2	Tierkohle	3	14	29	—
10	2	H_2O	3	19	—	—

Tabelle XIX.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 5 Tropfen	5% $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	11	27	—
2	2	Lunge	3	11	27	—
3	2	Herz	3	11	27	—
4	2	Niere	3	10	13	17
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	13	17	22
6	2	Lunge do.	3	11	40	—
7	2	Herz do.	3	13	40	—
8	2	Niere do.	3	11	27	41
9	2	Tierkohle	3	11	33	—
10	2	H_2O	3	14	37	—

Tabelle XX.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 10 Tropfen	5% $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	11	22	33
2	2	Lunge	3	11	33	—
3	2	Herz	3	17	51	—
4	2	Niere	3	9	12	14
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	24	124	—
6	2	Lunge do.	3	23	62	—
7	2	Herz do.	3	24	—	—
8	2	Niere do.	3	22	111	—
9	2	Tierkohle	3	24	—	—
10	2	H_2O	3	24	108	—

Tabelle XXI.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 2 Tropfen	5% $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	22	34	60
2	2	Lunge	3	7	11	13
3	2	Herz	3	23	48	—
4	2	Niere	3	—	3½	4
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	35	—	—
6	2	Lunge do.	3	35	—	—
7	2	Herz do.	3	29	—	—
8	2	Niere do.	3	35	—	—
9	2	Tierkohle	3	31	—	—
10	2	H_2O	3	31	—	—

Tabelle XXII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 30 Tropfen	5% $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	33	59	—
2	2	Lunge	3	7	8	11
3	2	Herz	3	20	82	—
4	2	Niere	3	—	2½	3
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	43	—	—
6	2	Lunge do.	3	43	—	—
7	2	Herz do.	3	43	—	—
8	2	Niere do.	3	43	—	—
9	2	Tierkohle	3	—	—	—
10	2	H_2O	3	37	—	—

In den Tabellen XVII bis XXII wurden dieselben Versuche mit dem gleichen Pferdeoxalatplasma, nachdem es 5 Tage im Eisschrank gestanden hat, wiederholt. Dabei ergaben sich erheblich längere Zeiten, bis die Gerinnung auftrat. Zu den Versuchen ist es deshalb dringend notwendig, daß zu Vergleichszwecken stets gleich altes, am besten aber ganz frisches Plasma zur Verwendung kommt, wie das ja auch schon von verschiedenen Autoren betont wurde.

4. Versuche mit extrahiertem Pferdeoxalatplasma und Organemulsionen:

In derselben Versuchsanordnung wie unter Ziffer 3 wurden die Emulsionen dem extrahierten Pferdeoxalatplasma zugesetzt. Da die kleineren Mengen von 2 bis 5 Tropfen ohne jeden Einfluß auf den Gerinnungsablauf waren, sind die Tabellen nicht mit angeführt worden.

Tabelle XXIII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 10 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	—	—	—
2	2	Lunge	3	—	—	—
3	2	Herz	3	—	—	—
4	2	Niere	3	22	57	—
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	—	—	—
6	2	Lunge do.	3	—	—	—
7	2	Herz do.	3	—	—	—
8	2	Niere do.	3	—	—	—
9	2	Tierkohle	3	—	—	—
10	2	H_2O	3	—	—	—

Tabelle XXIV.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 20 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	90	120	—
2	2	Lunge	3	41	104	—
3	2	Herz	3	—	—	—
4	2	Niere	3	7½	10	15
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	—	—	—
6	2	Lunge do.	3	—	—	—
7	2	Herz do.	3	—	—	—
8	2	Niere do.	3	—	—	—
9	2	Tierkohle	3	—	—	—
10	2	H_2O	3	—	—	—

Tabelle XXV.

Nr.	Plasmamenge ccm	Organemulsion 30 Tropfen	5%ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber	3	19	21	24
2	2	Lunge	3	21	39	—
3	2	Herz	3	—	—	—
4	2	Niere	3	6	7	8
5	2	Leber (extr. m. Petroläther u. Alkohol)	3	—	—	—
6	2	Lunge do.	3	—	—	—
7	2	Herz do.	3	—	—	—
8	2	Niere do.	3	—	—	—
9	2	Tierkohle	3	—	—	—
10	2	H_2O	3	—	—	—

Resultat: Wirksam sind nur die Emulsionen der nicht extrahierten Organe: Lunge, Niere und Leber und diese nur in größeren Mengen von 10 bis 30 Tropfen. Die extrahierten Organe ergaben genau wie die Kontrollen von Tierkohle und Wasser überhaupt keine Gerinnung.

5. Versuche mit nativem Pferdeoxalatplasma[1]) und den Organ-Fettrückständen.

Um auch hier Vergleichswerte zu erhalten, wurden die in Petroläther und Alkohol enthaltenen Fettrückstände nebeneinander gestellt. Vor den Versuchen wurde ihre Reaktion auf Lackmuspapier geprüft: Dabei ergab sich, daß die in Petroläther gelösten Rückstände nach der Aufnahme in Wasser durchweg neutrale, die in Alkohol wenig sauer reagierten. Es ist dies um so wichtiger, da bei längerem Stehen (1 bis 2 Tage) alle Rückstände stark saueren Charakter annehmen und dadurch gerinnungsverzögernd wirken. Schon von Stuber und Heim wurde ja auf diesen Punkt besonders hingewiesen.

Tabelle XXVI.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 2 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	41	47	52
2	2	Lunge do.	3	—	35	50
3	2	Herz do.	3	—	—	27
4	2	Niere do.	3	—	27	35
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	35	50	112
6	2	Lunge do.	3	41	84	112
7	2	Herz do.	3	35	41	50
8	2	Niere do.	3	—	40	50
9	2	Tierkohle	3	31	35	50
10	2	H_2O	3	41	108	—

[1]) Dieselben Versuche am Petrolätherplasma konnten noch nicht abgeschlossen werden, da der Bezug von Petroläther zur Zeit aus naheliegenden Gründen große Verzögerung erleidet. Diese Versuche werden in einer späteren Publikation nachgeholt werden.

Tabelle XXVII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 3 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	39	41	51
2	2	Lunge do.	3	—	41	48
3	2	Herz do.	3	39	45	51
4	2	Niere do.	3	—	25	29
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	—	31	38
6	2	Lunge do.	3	—	38	49
7	2	Herz do.	3	—	38	49
8	2	Niere do.	3	25	38	41
9	2	Tierkohle	3	33	56	67
10	2	H_2O	3	51	112	—

Tabelle XXVIII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 5 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	21	24	26
2	2	Lunge do.	3	—	—	39
3	2	Herz do.	3	19	26	38
4	2	Niere do.	3	18	21	26
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	26	29	30
6	2	Lunge do.	3	35	39	47
7	2	Herz do.	3	21	24	26
8	2	Niere do.	3	—	58	67
9	2	Tierkohle	3	30	58	58
10	2	H_2O	3	36	58	—

Tabelle XXIX.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 10 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	17	21	25
2	2	Lunge do.	3	18	21	25
3	2	Herz do.	3	21	25	33
4	2	Niere do.	3	14	16	18
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	25	29	33
6	2	Lunge do.	3	21	24	27
7	2	Herz do.	3	—	14	15
8	2	Niere do.	3	18	22	25
9	2	Tierkohle	3	21	25	38
10	2	H_2O	3	23	38	—

Tabelle XXX.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 20 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	—	10	10
2	2	Lunge do.	3	—	—	12
3	2	Herz do.	3	—	—	10
4	2	Niere do.	3	—	12	15
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	18	20	21
6	2	Lunge do.	3	—	—	10
7	2	Herz do.	3	—	—	17
8	2	Niere do.	3	7	8	10
9	2	Tierkohle	3	12	14	15
10	2	H_2O	3	21	23	24

Tabelle XXXI.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 30 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	7	9	11
2	2	Lunge do.	3	16	18	20
3	2	Herz do.	3	10	13	16
4	2	Niere do.	3	8	10	10
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	11	12	13
6	2	Lunge do.	3	—	—	9
7	2	Herz do.	3	—	—	11
8	2	Niere do.	3	—	—	9
9	2	Tierkohle	3	9	12	19
10	2	H_2O	3	24	25	32

Tabelle XXXII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 2 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	—	5	22
2	2	Lunge do.	3	—	5	16
3	2	Herz do.	3	—	7	16
4	2	Niere do.	3	—	7	21
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	—	9	27
6	2	Lunge do.	3	—	9	26
7	2	Herz do.	3	—	$4^1/_2$	19
8	2	Niere do.	3	—	$6^1/_2$	21
9	2	Tierkohle	3	—	9	29
10	2	H_2O	3	—	18	31

Tabelle XXXIII.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 3 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	—	13	28
2	2	Lunge do.	3	—	13	28
3	2	Herz do.	3	—	11	25
4	2	Niere do.	3	—	11	25
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	—	$13^1/_2$	29
6	2	Lunge do.	3	—	$13^1/_2$	30
7	2	Herz do.	3	—	18	26
8	2	Niere do.	3	—	10	28
9	2	Tierkohle	3	—	11	28
10	2	H_2O	3	—	18	32

Tabelle XXXIV.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 5 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	—	7	19
2	2	Lunge do.	3	—	$6^1/_2$	19
3	2	Herz do.	3	—	$6^1/_2$	$18^1/_2$
4	2	Niere do.	3	—	$5^1/_2$	25
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	—	7	14
6	2	Lunge do.	3	—	6	25
7	2	Herz do.	3	—	6	$18^1/_2$
8	2	Niere do.	3	—	5	14
9	2	Tierkohle	3	—	6	24
10	2	H_2O	3	—	8	32

Tabelle XXXV.

Nr.	Plasmamenge ccm	Fettextrakte 10 Tropfen	5 %ige $CaCl_2$-Lösung Tropfen	+	++	+++
1	2	Leber (Petroläther-Extrakt)	3	—	11	19
2	2	Lunge do.	3	—	9	14
3	2	Herz do.	3	—	11	25
4	2	Niere do.	3	—	9	25
5	2	Leber (Alkohol-Extrakt)	3	—	14	30
6	2	Lunge do.	3	—	$10^1/_2$	30
7	2	Herz do.	3	—	10	19
8	2	Niere do.	3	—	10	24
9	2	Tierkohle	3	—	11	25
10	2	H_2O	3	—	21	35

Resultat: Die Rückstände enthielten, da sie immer nur in kleinen Mengen frisch zubereitet zur Verwendung kamen, äußerst geringe Quantitäten von Fett und Lipoiden. Trotzdem ergaben sie beim Zusatz von 10 und mehr Tropfen eine deutliche Gerinnungsbeschleunigung, und zwar ging diese parallel der Länge der Extraktion. In den Tabellen XXXII bis XXXV wurden die Organe vergleichshalber etwa doppelt solange mit Petroläther extrahiert.

Zusammenfassung.

Diese Versuche zeigten also in vollkommener Übereinstimmung mit den Arbeiten von Stuber und seinen Mitarbeitern eine deutliche Gerinnungsbeschleunigung durch Organextrakte entsprechend deren Fettgehalt, wobei es einerlei ist, ob man die Organextrakte als solche oder deren extrahierte Fette allein zusetzt.

Extrakte von vollkommen entfettetem Organ haben gar keinen Einfluß mehr auf den Ablauf des Gerinnungsprozesses. Entfettetes und dadurch seines Gerinnungsvermögens beraubtes Plasma erhält durch Zusatz fettreicher Organextrakte diese Eigenschaft wieder vollkommen, während dieselben Organextrakte nach völliger Entfettung wirkungslos sind.

In welcher Weise sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht die in Frage stehenden Organfette bezüglich ihrer gerinnungsbeschleunigenden Wirkung einzuschätzen sind, und welche Rolle dem lipolytischen Ferment dabei zufällt, soll in einer späteren Mitteilung besprochen werden.

Literatur.

Morawitz, Deutsches Arch. f. klin. Med. 79, 1904; Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5.

Loeb, dortselbst weitere Versuche über Blutgerinnung.

Stuber und Heim, diese Zeitschr. 77, I und II, 1916.

Stuber und Partsch, dortselbst III.

Zak, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 70, 1912; 74, 1913.

Herzfeld und Klinger, diese Zeitschr. 82, 1917.

Yamada, diese Zeitschr. 87, 1918.

Wiechowski, diese Zeitschr. 81, 1917.

Zur pathogenetischen Bedeutung der Ölsäure bei Anämien.

Von

H. Beumer.

(Aus der Akademischen Kinderklinik in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 26. April 1919.)

Die experimentellen Grundlagen der Theorie, daß die Ölsäure das die Bothriocephalusanämie erzeugende perniziöse Blutgift darstellt, finden sich in den Arbeiten von Faust und Tallquist[1]).

Die Ölsäuretheorie war gewissermaßen ein Endergebnis des Studiums der Bothriocephalusanämien. Erst in jüngster Zeit wurde diese Frage durch Seyderhelm[2]) in neue Bahnen gelenkt, wobei allerdings nicht zu vergessen ist, daß schon 1898 Schaumann und Tallquist[3]) auf dem richtigen, aber nicht scharf als solchen erkannten Weg waren, indem sie durch Injektion wäßriger Extrakte von Bothriocephalus bei einem Hunde das typische Bild einer perniziösen Anämie erzeugen konnten. Die Aufmerksamkeit wurde jedoch durch Faust und Tallquist nach einer anderen Richtung gelenkt, als sie 1907 aus getrockneter Bothriocephalussubstanz ein als Cholesterinölsäureester erkanntes Lipoid isolierten und dieses zum schädigenden Prinzip des breiten Bandwurms proklamierten. Durch Erzeugung chronischer Ölsäurevergiftung bei Hunden und Kaninchen suchten sie ihre Hypothese zu erhärten. Eine durch 7 Monate fortgesetzte Verfütterung von Ölsäure an einem Terrier hatte nach starken als regenerative Anstrengungen der Erythropoëse gedeuteten Schwankungen schließlich eine erhebliche Anämie des Tieres zur Folge. Bei Kaninchen verursachte die subcutane Injektion

---

1) Faust und Tallquist, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **57**. Faust, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **58**.

2) Seyderhelm, Arch. f. klin. Med. **126**.

3) Schaumann und Tallquist, Deutsche med. Wochenschr. **1898**, 20.

von ölsaurem Natrium rapiden Hämoglobinsturz mit raschem tödlichen Ausgang. Ein ähnliches, stark hämolytisch wirksames Lipoid konnten Berger und Tsuchiya[1]) aus der Darmschleimhaut eines an Biermerscher Anämie Verstorbenen extrahieren. Somit schien die Möglichkeit gegeben, die in ihren Erscheinungsformen ähnlichen schweren Anämien verschiedenster Ätiologie-, Bothriocephalus-, Biermer-, Carcinomanämien [Grafe und Römer[2])] auf eine einheitliche pathogenetische Grundlage mit der Ölsäure als gemeinsamer Noxe zu stellen. Das Bild der chronischen Ölsäurevergiftung am Hunde wurde von Flury und Schmincke[3]) weiterhin studiert und in bezug auf das dabei beobachtete Verhalten der Erythrocyten eingehend charakterisiert. Als Resultat einer 16 Monate lang fortgesetzten Verfütterung von täglich 10 g Ölsäure an einen 7,5 kg schweren Hund fanden diese Autoren einen kurzdauernden beträchtlichen Sturz der roten Blutkörperchen mit langsamer, aber vollständiger Reparation, die mit einer charakteristischen, im Sinne einer Schutzmaßregel gedeuteten Veränderung der Erythrocyten in biologischer und chemischer Beziehung in Zusammenhang gebracht wurde. Die Blutkörperchen zeigten nämlich eine spezifische Resistenzerhöhung gegen Ölsäure, als deren chemisches Korrelat das Vorhandensein überwiegender Mengen von Cholesterinestern festgestellt wurde.

Der kritischen Besprechung dieser Ergebnisse Flurys und Schminckes und ihrer Deutung schicke ich die Befunde einer eigenen an zwei Hunden durchgeführten Ölsäurefütterung voraus[4]). Ich ging dabei von dem Gedanken aus, daß, wenn der Ölsäure wirklich eine erhebliche schädigende Wirkung im Sinne eines Blutgiftes innewohnt, diese in ganz besonderer Weise bei jungen wachsenden Tieren in Erscheinung treten mußte; denn es ist bekannt, daß gerade das jugendliche Blut leichter auf alimentäre Einflüsse reagiert, ihnen weniger Widerstand entgegensetzt und mehr zu einem Rückschlag ins Embryonale als reaktiver Wirkung auf gesetzte Schädigungen neigt. Außerdem richtete ich meine Aufmerksamkeit auf etwaige störende Wirkungen der Ölsäure auf Wachstum und Knochenbildung, da in dieser Beziehung den Fettsäuren bei der Entwicklung der Säuglinge eine besondere, aber noch nicht sicher nachgewiesene Bedeutung beigemessen wird (Czerny).

---

[1]) Berger und Tsuchiya, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **96**.

[2]) Grafe und Römer, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **96**.

[3]) Flury und Schmincke, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **64**.

[4]) Diese Versuche wurden Anfang 1914 in der Universitäts-Kinderklinik in Halle gemacht.

Zu meinen **Versuchen** dienten 3 junge Hunde im Alter von 3 Wochen vom gleichen Wurf.

Der eine erhielt täglich, der andere mit Abständen 20 bis 30 g Ölsäure durch Magensonde. Der 3. Hund diente zur Kontrolle. Im Beginn zeigten die Hunde infolge starken Widerwillens und Ekels verminderte Freßlust, zeitweilig Durchfälle und etwas struppiges Fell. Später wurde die Sondenfütterung anstandslos vertragen. Nach 4 Monaten mußten die Versuche wegen Kriegsausbruches abgebrochen werden. Infolgedessen fehlen die Sektions- und Organbefunde; jedoch wird dadurch die Beurteilung der Ölsäurewirkung auf das Blut, wie später erörtert werden soll, nicht entwertet. Die folgende Tabelle zeigt zahlenmäßig das Verhalten des Blutes und Körpergewichtes des Kontrollhundes und des „Ölhundes" I bei täglicher Ölsäurezufuhr.

Datum	Gewicht		Hämoglobin		Blutkörperchen		Bemerkungen
	Öl-hund I	Kon-troll-hund	Öl-hund I	Kon-troll-hund	Öl-hund I	Kon-troll-hund	
25. III. 14	3250	3400	70	75	7200	6860	
1. IV.	3400	3500	70	75	7420	7240	Beginn von täglich 20 g Ölsäure
10. IV.	3200	3650	65	75	6500	7200	Blutbild o. B.
20. IV.	3100	3800	65	80	6760	7500	Blutbild o. B.
7. V.	3500	4200	70	75	6740	6950	
1. VI.	4000	4700	70	80	7220	7460	
4. VII.	4800	5200	70	80	7150	7320	
25. VII.	4700	5400	75	80	6900	7200	Am 20. 7. Blutentnahme von 50 ccm

Zu Beginn des Versuches war eine mäßige Abnahme des Körpergewichts mit Verminderung des Hämoglobins und der Zahl der roten Blutkörperchen eingetreten. Nach dem Eindruck, den die Tiere sonst machten, waren aber diese Erscheinungen weniger auf eine spezifische Schädigung durch Ölsäure, als auf den widerlichen Geschmack des Präparates zurückzuführen, der zu geringerer Nahrungsaufnahme veranlaßte. Irgendwelche Zeichen von einer hämolytischen Wirkung der Ölsäure ließen sich weder im Serum noch im Blutbild nachweisen. Der Ölhund I erhielt im Vergleich zu dem doppelt so schweren Versuchshund Flurys und Schminckes und den Versuchshunden Fausts die vierfache Menge an Ölsäure. Trotzdem war das Tier nach eingetretener Gewöhnung stets munter. Sichtbare rachitische Veränderungen bildeten sich nicht aus, die Körpergewichtszunahme war befriedigend.

Es haben also beim Hunde selbst große, längere Zeit gegebene Ölsäuremengen nach einer kurzen durch Appetitmangel

und Durchfälle verursachten Entwicklungshemmung keinen wahrnehmbaren Einfluß auf Knochenbau und allgemeines Wachstum gezeitigt. Die Übertragung dieses Versuchsergebnisses auf die menschliche, vor allem kindliche Pathologie kann natürlich nur mit größter Reserve versucht werden. Es wird aber dadurch doch immerhin die Möglichkeit einer Schädigung durch höhere Fettsäuren, die unter natürlichen Bedingungen nur in bedeutend geringeren Quantitäten bei Anomalien des Fettstoffwechsels im Organismus auftreten könnten, zum mindesten sehr in Frage gestellt.

An dem Blut meiner Hunde wurden zu verschiedenen Zeiten Resistenzbestimmungen gegen Ölsäure und Saponin angestellt. Die Saponinresistenz der Ölhunde-Erythrocyten war niemals, verglichen mit Normalerythrocyten, verändert. Zwei Resistenzbestimmungen, von denen eine an das Ende der viermonatigen Ölsäurefütterung fällt, sind in den beiden folgenden Tabellen dargestellt.

Resistenzbestimmung gegen Natrium oleinicum

am 8. VI. 14.

0,25 ccm 5 $^0/_0$ige Blutkörperchenaufschwemmung + 3 ccm Natr. oleat. Kochsalzlösung.

+ = deutliche Hämolyse, Ö I = Ölhund I,
Sp = Spur Ö II = Ölhund II,
fk = fast komplette Hämolyse, K = Kontrollhund,
k = komplette Hämolyse.

Hämolyse nach Min.	1 : 1000			1 : 2000			1 : 4000			1 : 6000			1 : 8000			1 : 10000			1 : 12000			1 : 14000			1 : 20000		
	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K
1	k	k	k																								
3				+	+	+																					
5				++	k	k																					
8				k	k	k	+	+	+																		
10																											
15							fk	k	k				Sp	Sp	+	Sp	0	Sp	0	0	Sp	0	0	Sp			
20							k	k	k	+	fk	k															
25										fk	k	k															
30										k	k	k	Sp	Sp	fk												
45													Sp	Sp	k	+	fk	fk	Sp	Sp	fk	Sp	Sp	fk	0	0	0
60																+	+	fk							Sp	Sp	+
90													k	k	k	k	k	k	+	+	fk	+	+	fk	Sp	Sp	+

Hämolyse mit Ölsäure-Emulsion

am 20. VII. 14.

0,25 ccm 5% gewaschener Blutkörperchen.
2,0 ccm Ölsäure-Emulsion in NaCl-Verdünnungen 1:1000, 1:2000 usw.

Hämolyse nach	1 : 1000			1 : 2000			1 : 4000			1 : 8000			1 : 12000			1 : 16000			1 : 20000		
Min.	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	Ö I	Ö II	K	O I	Ö II	K
3	k	k	k																		
6				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
16				fk	fk	fk	fk	fk	fk	k	fk	fk	fk	fk	fk	0	0	0	0	0	0
30				k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	Sp	Sp	Sp	Sp	0	0
60																k	k	k	+	0	0
180																			k	fk	+

Aus diesen Tabellen ist ersichtlich, daß sich eine nennenswerte Resistenzerhöhung der Erythrocyten im Laufe der Ölsäurefütterung nicht herausgebildet hat.

Einen weiteren Beweis gegen die hämolytische Wirksamkeit der Ölsäure im Blut ergab die folgende Versuchsanordnung.

Von beiden Ölhunden wurde 8 Stunden nach einer reichlichen Ölsäuremahlzeit (40 g), also zu einem Zeitpunkt, da erwartungsgemäß größere Mengen Ölsäure im Blut zirkulieren mußten, Serum entnommen, mit gewaschenen normalen Hundeblutkörperchen vermischt und 12 Stunden im Brutschrank digeriert. Das daraufhin abzentrifugierte Serum zeigte keine Spur Hämolyse. Um die Ölsäurewirkung aufzuheben, bedarf es also keiner erst zu erwerbenden Ölsäurefestigkeit der Erythrocyten.

Eine große Bedeutung bei den Versuchen Flurys und Schminckes ist der Feststellung von großen Mengen Cholesterinester in den Blutkörperchen beizulegen. Die Blutkörperchen meines Ölhundes I wurden daraufhin am 20. VII. 14 nach der Windausschen Methode untersucht.

7 g gewaschene und getrocknete Blutkörperchen wurden mit Alkohol und Äther erschöpfend extrahiert, das Extrakt geteilt und in einer Hälfte a das freie, in der zweiten b nach Verseifung das Gesamtcholesterin bestimmt.

Extrakthälfte a ergab 0,0570 Dig. Chol. = 0,396% freies Cholesterin,
„ b „ 0,0558 „ „ = 0,387% Gesamtcholesterin.

Somit war in den Blutkörperchen des Ölhundes I das Cholesterin nur in freier Form enthalten, und zwar entsprechen die gefundenen Werte denen normaler Hundeerythrocyten. Nach Hoppe-Seylers alten Untersuchungen beträgt der Cholesterin-

gehalt der Hundeblutkörperchen 0,36 %, nach den jüngeren Feststellungen Thaysens 0,47 %. Flury und Schmincke fanden bei ihrem Hunde 0,307 Cholesterin aus Estern.

Nach Mitteilung dieser Resultate gehe ich zur Erörterung der „Ölsäurevergiftung“ über, wie sie sich in ihrer Wirkung nach den vorliegenden Arbeiten darstellt. Beim Hunde Flurys und Schminckes trat schon in der Vorversuchsperiode vom 24. bis 30. XII. eine als Gefangenschaftsanämie erklärte Verminderung der Blutkörperchen um 1,2 Millionen ein. Am 1. XII. begann die Ölsäurefütterung und schon am 9. XII. erreichte die Blutkörperchenzahl ihren niedrigsten Stand mit einer Abnahme von 2,1 Millionen. Zwischen 1. und 9. XII. werden keine Zahlen angegeben. Es ist nicht ersichtlich, ob der durch Gefangenschaftsanämie erfolgte Blutkörperchensturz mit dem 1. XII. seinen Abschluß erreicht hatte und das weitere schnelle Absinken der Blutkörperchen allein der Ölsäurewirkung zugeschrieben werden kann. Diese Frage spielt aber nicht eine so wesentliche Rolle wie vielmehr der Umstand, daß schon nach 9 Ölsäuretagen die Zahl der Blutkörperchen und des Hämoglobins wieder beständig steigt und am 30. XII. den alten Stand erreicht, der durch weitere 15 Monate fortgesetzte Ölsäurezufuhr nicht mehr ungünstig beeinflußt wird. Der durch die Ölsäure gesetzte Schaden wäre also höchstens ein akuter. Eine chronische Ölsäurevergiftung ohne Erscheinungen ist nicht vorstellbar. Betrachtet man daher mit Flury und Schmincke die an den Erythrocyten gefundenen Veränderungen von Resistenzerhöhung und chemischer Abartung als Abwehrmaßregeln des Organismus, so muß man annehmen, daß diese Waffen bereit waren zu dem Zeitpunkt, als der Körper begann, sich mit Erfolg der Ölsäurewirkung zu erwehren. Das wäre also schon nach der ersten Woche der Ölsäureüberschwemmung. Dagegen zeigen meine Versuche, daß der Körper auch ohne Resistenzerhöhung seiner Blutkörperchen mit noch größeren Mengen Ölsäure fertig wird. Die vermehrte Widerstandsfähigkeit der Erythrocyten, zu deren Ausbildung zugegebenermaßen der Zeitfaktor eine Rolle spielen mag, kann daher nicht ein unentbehrliches Mittel im Kampf gegen die Ölsäure sein, wenn man nach den vorliegenden Ergebnissen nicht überhaupt den Gedanken aufgeben will, die

Ölsäure als ein für den Organismus besonders schädliches Nahrungs- und Blutgift zu betrachten.

Am weitaus interessantesten sind die chemischen Veränderungen, die Flury und Schmincke an den Blutkörperchen ihres Hundes gefunden zu haben glauben, jedoch erscheinen gerade diese am wenigsten sicher fundiert. Die Autoren schreiben, daß sie erst nach mehrfacher energischer Verseifung größere Mengen Cholesterin aus dem Blutkörperchenextrakt gewinnen konnten und folgern daraus sowie aus der gefundenen Jodzahl das Vorkommen von Cholesterinestern der Palmitin- und Ölsäure. Es fragt sich, ob diese Kriterien genügen. Die Cholesterinester wurden nicht selbst dargestellt und als solche identifiziert. Wir haben inzwischen durch Windaus im Digitonin ein zuverlässiges Mittel gewonnen, die Anwesenheit selbst kleiner Mengen von Cholesterinestern einwandfrei nachzuweisen. Mit dieser Methode enthielten bei meinem Ölhund I die Blutkörperchen keine Spur von gebundenem Cholesterin. Auch in früheren Versuchen bei Übertragung der Ölsäuretheorie auf die menschliche Pathologie konnten Bürger und ich[1]) in den Blutkörperchen bei perniziöser Anämie keine Cholesterinester feststellen. Man muß sich fragen, ob eine überwiegende Menge von Cholesterinestern mit den Funktionen der Lipoidhülle der Blutkörperchen überhaupt in Einklang gebracht werden kann, vor allem aber, ob eine solche spezifische Resistenzerhöhung gegen Ölsäure infolge Anwesenheit von Cholesterin denkbar ist, ohne von einer starken Resistenzverminderung gegenüber Saponinen begleitet zu sein. Die einseitige Spezifität der Resistenz wird aber von Flury und Schmincke besonders betont. Wir wissen, daß der Resistenzgrad der Blutkörperchen gegen Saponine von ihrem Cholesteringehalt direkt abhängig ist. Bei Saponininjektionen geht die Zunahme der Saponinresistenz mit einer Vermehrung des freien Cholesterins in den Blutkörperchen parallel [Wacker und Hueck[2])]. Die hämolytische Wirkung der Saponine wird durch freies Cholesterin gehemmt, nicht aber durch Cholesterinester. Die Vorstellung einer aus Cholesterinestern bestehenden Lipoidmembran mit

[1]) Beumer und Bürger, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 13.
[2]) Wacker und Hueck, Arch. f. experim. Pathol. u. Therap. 74.

unveränderter Resistenz gegen Saponine würde also erheblichen Schwierigkeiten begegnen. Ich glaube daher, daß angesichts der anfechtbaren Annahme von Cholesterinestern, für die von Flury und Schmincke gefundene Resistenzsteigerung gegen Ölsäure eine andere Deutung gesucht werden muß.

Die von Faust und Tallquist als eigentliches Bothriocephalusgift angenommenen Cholesterinölsäureester als solche besitzen keine hämolytischen Fähigkeiten. Serumfreie, mit einer Cholesterinölsäureester-Emulsion geschüttelte Blutkörperchen werden selbst nach 24 stündigem Stehen im Brutschrank nicht hämolysiert, was zugleich gegen das Vorkommen einer Cholesterase in den Erythrocyten spricht, da eine Spaltung selbst geringer Mengen der Cholesterinester Hämolyse hervorrufen müßte.

Bei subcutaner Einverleibung von 16 g Cholesterinölsäureester in einer kürzeren Periode bei einem Kaninchen fand sich ein größerer Teil des Injizierten noch unresorbiert im Unterhautzellgewebe, ein Teil in Form gelber Tröpfchen noch ungespalten im Mesenterialfett. Die Resistenzprüfung ergab gegen Saponin keine, gegen Ölsäure eine ganz geringe Verschiebung.

Hämolyse nach	Saponin	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{20000}$	$\frac{1}{40000}$	$\frac{1}{60000}$	$\frac{1}{80000}$
1 Stunde 24 Stunden	Cholesterin- kaninchen	k k	fk k	+ fk	Sp +	0 Sp
1 Stunde 24 Stunden	Normal- kaninchen	k k	fk k	fk fk	0 fk	0 Sp

Hämolyse nach	Ölsäure-Emulsion	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{4000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{8000}$	$\frac{1}{10000}$
1 Stunde 24 Stunden	Cholesterin- kaninchen	k k	k k	Sp k	0 fk	0 +
1 Stunde 24 Stunden	Normal- kaninchen	k k	k k	k k	Sp k	Sp k

Von klinischer Seite wurden sofort erhebliche Bedenken gegen die Richtigkeit der Ölsäuretheorie der perniziösen Anämie erhoben. Mit Recht wurde hervorgehoben, daß es Faust und seinen Schülern niemals gelungen ist, durch noch so lange fort-

gesetzte Ölsäurefütterungen das wirkliche Bild einer perniziösen Anämie hervorzurufen. Die erzeugten Anämien haben das Charakteristische geringgradiger sekundärer Blutveränderungen mit mäßig herabgesetzten Blutkörperchenzahlen und vermindertem Hämoglobinindex. Wenn Faust daher angibt, einwandfrei festgestellt zu haben, daß die Ölsäure das hämolytisch wirksame Gift des breiten Bandwurms ist und per os verfüttert im Organismus die gleiche hämolytische Wirkung entfaltet wie im Reagensglase, so geben dieser Schlußfolgerung die vorliegenden Ergebnisse keine Beweiskraft. Vielmehr liegen die Verhältnisse im Serum ganz anders wie im Reagensglase. Die Schutzkraft des Serums ist eine ganz evidente, wie wir sie in ähnlicher Weise bei den schweren Formen von Retentionsikterus sehen, bei dem trotz Überschwemmung des Blutes mit (im Reagensglas) stark hämolytisch wirksamen Gallensäuren fast nie eine Hämolyse beobachtet wird. Die Entgiftung der verfütterten Ölsäure ist auf verschiedenen Wegen denkbar. Möglich ist ihre Bindung an Cholesterin zu Cholesterinestern; jedoch stieg bei meinen Versuchen die Menge der Cholesterinester im Blutserum selbst nach Verfütterung großer Ölsäuremengen (150 ccm) nicht erheblich an. Auch führte eine 24-Bebrütung einer Mischung von Blut und Ölsäure im Brutschrank nicht zur Bildung von Cholesterinestern. Die Entgiftung erfolgt daher wahrscheinlich durch Bildung von Glycerinestern. Nach Faust konnten nach Ölsäurefütterung beträchtliche Mengen Ölsäure aus dem Chylus mittels einer Ductus thoracicus-Fistel gewonnen werden. Nach den jüngsten Arbeiten von Bang[1]) aber wird die Hauptmenge der Fettsäure der Leber durch die Pfortader zugeführt. Auch normalerweise kommen in der Leber größere Mengen freier Fettsäuren vor. Die Annahme erscheint daher berechtigt, daß der Angriff der Ölsäure schon durch die synthetischen Kräfte des Darmepithels, im übrigen aber durch das Serum und die Leber abgeschlagen wird, bevor er die Blutkörperchen überhaupt erreicht. Auch von Faust wurden Zeichen einer am Serum sichtbaren hämolytischen Wirkung nicht beobachtet. Diese treten allerdings bei intravenöser Zufuhr von Ölsäure bzw. ölsaurem Natrium

---

[1]) Bang, diese Zeitschr. 91.

auf, deren Einverleibung in die Zirkulation mit dem Leben der Tiere unvereinbar ist (Munk, Jastrowitz[1]), eigene Versuche). Nach Munks Ansicht starben die Tiere dabei an plötzlichem Herztod.

Es bliebe noch die Möglichkeit eines pathologischen endogenen Fettabbaues, bei dem freiwerdende Ölsäure hämolytische Wirkungen auslösen könnte. Eine solche Möglichkeit bei ätiologisch ungeklärten Anämien des Kindesalters deutet v. Pfaundler[2]) kurz an. Jedoch fehlen dafür vollends die Beweise, wie wohl auch diese hypothetische Erwägung nur unter dem Eindruck der Ölsäuretheorie Fausts entstanden ist. Das gleiche gilt für die von Kleinschmidt[3]) in das Bereich der Möglichkeit gezogene schädigende Wirkung der Ölsäure bei den alimentären Formen der Säuglingsanämien. Welche Mengen von Ölsäure der wachsende Organismus ohne erhebliche Schädigung seines Blutes und Wachstums vertragen kann, geht aus den beschriebenen Versuchen an jungen Hunden hervor.

Es muß daher abgelehnt werden, der Ölsäure eine pathogenetische Bedeutung für die perniziösen Anämien einzuräumen. Ebensowenig kann eine charakteristische, im Laufe der Ölsäurefütterung erworbene relative Ölsäurefestigkeit der Erythrocyten mit partieller Abartung der Lipoide durch Substitution des freien Cholesterins durch Cholesterinester bestätigt und ihrer Deutung als Abwehrmaßnahme des Körpers gegen die hämolytische Wirkung der Ölsäure beigestimmt werden.

---

[1]) Jastrowitz, Zeitschr. f. klin. Med. 1914.
[2]) v. Pfaundler, Feers Lehrb. d. Kinderheilkunde.
[3]) Kleinschmidt, Jahrb. f. Kinderheilk. 83.

Über Wirkung und Entgiftung eingeatmeter Blausäure.

Von

Ferdinand Flury und Wolfgang Heubner.

(Aus der Pharmakologischen Abteilung des Kaiser-Wilhelm-Instituts für physikalische Chemie und Elektrochemie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 30 April 1919.)

Vor kurzem haben Teichmann und Nagel[1]) über Versuche an Mäusen berichtet, durch die sie die seit 1895 bekannte Tatsache bestätigen, daß Natriumthiosulfat prophylaktisch gegen Blausäurevergiftung wirksam ist. Sie haben weiter die Feststellung von Schankies[2]) bestätigt, daß im Durchschnitt die Erholungszeit vergifteter Tiere etwas kürzer ist, wenn ihnen nach Aufenthalt in einer Blausäureatmosphäre Thiosulfat injiziert wird, d. h. bei nicht tödlich vergifteten Tieren macht sich die bekannte entgiftende Wirkung des Thiosulfats auch bei nachträglicher Zufuhr ein wenig geltend. Teichmann und Nagel haben nicht erweisen können, daß tödlich vergiftete Tiere nach Einatmung von Blausäure durch nachträgliche Zufuhr von Thiosulfat gerettet werden können. Dies verdient wegen der praktischen Bedeutung der Frage mit aller Schärfe hervorgehoben zu werden, um so mehr, als die Autoren in ihren Schlußfolgerungen zu dem Resultat kommen, daß durch „therapeutische Behandlung Vergifteter" die Unglücksfälle bei Blausäurevergasungen, wie sie jetzt zum Zwecke der Schädlingsbekämpfung in großem Umfang stattfinden, verringert werden könnten. Nach unserer Ansicht muß aber die Errettung vom Tode das

---

[1]) Diese Zeitschr. **93**, 312, 1919.

[2]) Beitäge zur experimentellen Therapie der Blausäurevergiftung. Inaug.-Diss. Königsberg 1918.

erste Ziel einer gegen Unglücksfälle gerichteten Maßregel sein, während ein etwas schnellerer Verlauf einer im allgemeinen von selbst rasch fortschreitenden Erholung nur geringe Bedeutung haben kann.

Über die Rettung tödlich vergifteter Tiere nach Blausäureeinatmung durch Thiosulfat haben wir bereits vor längerer Zeit Versuche an Katzen angestellt und zwar mit intravenöser Injektion; wir sind damals zu dem Resultat gekommen, daß eine sichere Wirkung nicht festzustellen ist und in praxi bei akuter Vergiftung keine Rolle spielen kann, denn bei den Grenzdosen ist es nie mit Bestimmtheit vorauszusagen, ob das Tier ohne Thiosulfat sterben würde, und bei sicher tödlichen Dosen verläuft die Vergiftung so rasch, daß die Behandlung immer zu spät kommt — selbst im Laboratorium, wo alles zur Injektion bereit steht, geschweige denn im Ernstfalle. Das außerordentlich rasche Tempo der Vergiftung, worin die Einatmung des Giftes die anderen Applikationen noch wesentlich übertrifft, scheint uns also eine Thiosulfatbehandlung ganz aussichtslos zu machen. Soviel über die Heilversuche. Der prophylaktischen Methode — Einspritzung von Thiosulfat bei den mit Blausäurevergasungen beschäftigten Personen vor der Arbeit — stehen wir ebenfalls aus praktischen Gründen sehr skeptisch gegenüber. Deswegen haben wir auch seinerzeit weitere Versuche abgebrochen.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir aber noch auf eine bei unseren Arbeiten mit Blausäure gemachte Beobachtung hinweisen. Systematische Versuche mit verschieden hohen Konzentrationen bei verschiedener Einatmungszeit haben uns gezeigt, daß nicht alle Vergiftungen in dem oben erwähnten raschen Tempo verlaufen. Es gibt eine Vergiftungsform durch Einatmung, die eine besondere Stellung einnimmt, die übrigens auch von Teichmann und Nagel nicht berücksichtigt worden ist. Sie kommt nur zustande, wenn ganz bestimmte Konzentrationen des Blausäuredampfes längere Zeit eingeatmet werden. Für Katzen liegen diese Konzentrationen um 0,10 mg pro Liter Luft herum. Sie können mehrere Viertelstunden lang ohne tödlichen Erfolg eingeatmet werden, bewirken dabei aber eine schwere Vergiftung, deren Höhepunkt nach 5 bis 15 Minuten erreicht wird, um dann, ähnlich wie etwa bei der Narkose,

stationär zu bleiben: Bewußtlosigkeit, langsame, krampfhaft vertiefte Atmung, ab und zu leichte Krämpfe. Bringt man solche Tiere nach längerer Zeit wieder in reine Luft, so bessert sich regelmäßig die Atmung. Trotzdem kann es geschehen, daß eine völlige Erholung ausbleibt und der Tod noch nachträglich, unter Umständen erst nach mehreren Stunden eintritt. Dabei ist uns der charakteristische Befund aufgefallen, daß in der Leiche hellrotes Blut angetroffen wird; die Lähmung der Oxydationsfermente kann also die Blausäureatmung erheblich überdauern, während die Störung der Atmung sich rasch erholt.

Diese Beobachtung scheint uns auch in theoretischer Beziehung von großem Interesse. Denn sie ist schwer vereinbar mit der Auffassung von Geppert[1]), nach der auch die zentralen Symptome der Blausäurevergiftung hauptsächlich Folge der gestörten Oxydation sein sollen[2]).

Bei dem genannten Vergiftungstypus kommt es also trotz ständig erneuter Giftzufuhr nicht zur Lähmung des Atemzentrums, weil sich hier offenbar ein Gleichgewichtszustand einstellt, bei dem fortwährend Blausäure durch Ausscheidung oder Zerstörung oder sonstwie unschädlich gemacht und eine bestimmte Konzentration des Giftes an den empfindlichen Elementen der nervösen Zentren nicht überschritten wird. In dieser Beziehung läßt also die Blausäure eine gewisse Analogie mit der Wirkungsweise der flüchtigen Inhalationsnarkotica der Fettreihe erkennen. Daß die Tiere in diesem Zustand ein Vielfaches der bei höherer Konzentration schnell tödlich wirkenden absoluten Dosis einatmen, verdient besondere Beachtung. Es ergibt sich daraus nämlich, daß eine strikte tödliche Dosis für eingeatmete Blausäure nicht aufgestellt werden kann; ihre Giftigkeit ist innerhalb weiter Grenzen abhängig von der eingeatmeten Konzentration.

Noch ein weiterer Punkt möge hier erwähnt werden. Die Vergiftung durch sehr schwache Konzentrationen hat ausgesprochen reversiblen Charakter. Wenn man Tiere mit Konzentrationen, die etwa 0,2 bis 0,4 mg Blausäure im Liter

---

[1]) Über das Wesen der Blausäurevergiftung. Berlin 1889.

[2]) Vgl. W. Ewald, Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. 33, 335, 1907. — v. Tappeiner, Lehrb. d. Arzneimittellehre. 11. Aufl. 1916, 251.

Luft enthalten, bis zum Eintritt von Atemstillstand und völliger Bewußtlosigkeit vergiftet und dann zur Vermeidung des Herzstillstandes sofort wieder in frische Luft bringt, kommt die Atmung bald wieder spontan oder nach einigen Thoraxkompressionen in Gang, und die Tiere erholen sich in der Regel wieder vollständig. Während dieser Erholungsperiode treten nun, wie wir besonders häufig bei Katzen gesehen haben, die anfänglichen Vergiftungssymptome, aber in umgekehrter Reihenfolge, wieder auf. Es kommt wieder zu Krämpfen, Atembeschleunigung, Erregungszuständen, motorischen Störungen, Ataxie usw. Diese Form der Vergiftung dürfte sich gut zum Studium und zur anschaulichen Darstellung reversibler Vergiftungsprozesse eignen.

Auf Versuche über die Behandlung der „stationären" Blausäurevergiftung mit Thiosulfat haben wir verzichtet. Denn für sie gilt erst recht, daß der spontane Verlauf niemals sicher vorauszusehen ist, sondern von Individuum zu Individuum schwankt. Von zwei gleichzeitig unter scheinbar absolut gleichen Bedingungen vergifteten Tieren kann das eine auch nach langdauernder Vergiftung noch eine ziemlich rasche Erholung zeigen, während das andere in der beschriebenen Weise nachträglich zugrunde geht. Ob es sich bei solchen bedrohten Fällen darum handelt, die Blausäure möglichst rasch chemisch zu entgiften, oder nicht vielmehr darum, die — vielleicht auch im Herzmuskel? — irreparabel geschädigte Fermenttätigkeit wieder in Gang zu bringen, möchten wir dahingestellt sein lassen. Immerhin wollen wir nicht mit Bestimmtheit behaupten, daß bei so gearteten Fällen von Blausäurevergiftung am Menschen nicht auch einmal Thiosulfat nützlich sein könnte. Die besten Behandlungsmethoden der Blausäurevergiftung nach Einatmung sind jedoch immer noch die Zufuhr von Sauerstoff und die künstliche Atmung, von der wir auch in Tierversuchen häufig überraschende Erfolge selbst bei schwersten Vergiftungen sahen.

Die sichere Dosierung gasförmiger Blausäure ist nicht leicht. Wir haben z. T. mit Strömungskammern unter gleichzeitiger Analyse der Kammerluft, z. T. mit großen, gut gedichteten Kammern (von 1 bis 12 cbm) gearbeitet, in denen abgemessene Mengen reiner, wasserfreier Blausäure zerstäubt

wurden. Hierbei wurden die verwendeten Konzentrationen so weit wie möglich fortlaufend durch chemische Analysen kontrolliert. Leider sind die meisten in der Literatur enthaltenen Untersuchungen über die Wirkung von Gasen, auch die von Teichmann und Nagel, ohne chemische Kontrolle der bei den Versuchen wirklich vorhandenen Gaskonzentrationen durchgeführt worden. Dadurch wird die Unsicherheit der Dosierung, die bei toxikologischen Gasversuchen aus zahlreichen Gründen stets vorhanden, z. T. kaum vermeidbar ist, besonders groß und die Reproduktion solcher Versuche fast unmöglich.

Als Analysenmethode haben wir uns eines von Professor H. Wieland-München im hiesigen Institut ausgearbeiteten Verfahrens bedient, das auf der Absorption von Blausäure durch Jodlösung beruht und bequem, sicher und schnell zu arbeiten gestattet. Die blausäurehaltige Luft wird durch eine kleine Waschflasche mit Jodlösung, die mit etwas Stärke und Bicarbonatlösung versetzt ist, geleitet; das Ende der Reaktion wird durch die Entfärbung der Jodlösung erkannt. Die Waschflasche hat ein capillares Einleitungsrohr mit einem auf dieses aufgesetzten Dreiweghahn, dessen eine Öffnung mit dem Zuleitungsrohr aus dem Gasraum in Verbindung gebracht wird, während die andere Öffnung in ein kurzes offenes Glasrohr mündet, das zum Durchspülen des Apparates mit dem Blausäureluftgemisch vor Beginn der Absorption verwendet wird. Zuerst saugt man so lange Gas aus dem Versuchsraum, bis das Zuleitungsrohr völlig damit gefüllt ist, dann stellt man den Dreiweghahn um und saugt das zu analysierende Luftgemisch durch die Waschflasche mit Jodlösung. Man läßt zweckmäßig so lange Wasser aus einer mit der Waschflasche verbundenen graduierten Pipette ausfließen, bis die Jodlösung entfärbt ist. Als Maß der durchströmenden Blausäureluftmischung benutzt man die aus der Pipette ausfließende Wassermenge. Bei Blausäurekonzentrationen von 0,1 bis 0,5 $^0/_0$ genügen 10 ccm $^n/_{1000}$-Jodlösung, 1 ccm 1 $^0/_0$ige Natriumbicarbonatlösung und 10 Tropfen 0,5 $^0/_0$iger Stärkelösung. Der Blausäuregehalt der Luft in mg pro Liter ist dann gleich dem Verhältnis 135: verbrauchtes Gasvolumen in ccm.

$$\left(HCN + 2\,J = JCN + HJ;\ 1\,\text{Jod} = \frac{HCN}{2} = 13{,}5\right).$$

Bei sehr geringen Konzentrationen legt man entsprechend weniger Jodlösung vor, natürlich müssen auch größere Mengen Luft durchgesaugt werden. Bei einem Gehalt von 0,01 mg Blausäure im Liter Luft (etwa 0,001 Volumprozent) muß man beispielsweise bei Vorlegung von 1 ccm $^{n}/_{1000}$-Jodlösung für die Analyse 1 350 ccm der blausäurehaltigen Luft entnehmen.

Unsere Zahlenwerte stimmen mit denen von K. B. Lehmann und seinen Schülern Wagschal[1]) und Ahlmann[2]) gut überein. Akut tödlich für Katzen sind Konzentrationen über 0,35 mg pro Liter Luft; Atemstillstand binnen 2 Minuten, Herzstillstand binnen 10 Minuten. Mit sinkender Konzentration treten die ersten Erscheinungen später ein, die Vergiftungszeit wächst; bei 0,12 mg erfolgt erst nach $^{1}/_{2}$ Stunde Atemstillstand. Die Erholung nach untertödlicher Vergiftung ist deutlich langsamer als bei gleichstarker aber rascherer Vergiftung (durch höhere Dosen). Offenbar wird die Schädigung der Fermenttätigkeit mit zunehmender Wirkungsdauer schwerer reparabel. Dauernd ertragen werden Konzentrationen unterhalb 0,06 mg pro Liter; doch rufen sie bei vielen Individuen noch Vergiftungssymptome hervor.

Hierfür können folgende Versuche als Beleg dienen. Eine Katze wurde in einem Gasraum von $^{1}/_{3}$ cbm Fassungsvermögen, der mit einer konstanten, chemisch analysierten Blausäureatmosphäre von 0,062 mg im Liter Luft durchströmt wurde, eine Stunde lang gehalten. Nach 6 Minuten ganz geringe Atemvertiefung, die nach 15 Minuten deutlicher wurde. Nach 45 Minuten Andeutungen von Ataxie, geringfügiges Taumeln. Sonst blieb das Tier symptomlos, erkrankte auch nicht nach dem Versuch.

Eine zweite Katze blieb unter den gleichen Verhältnissen zunächst 30 Minuten lang symptomlos, nach 40 Minuten traten Erbrechen, leichte Krämpfe, vertiefte Atmung ein. Nach 43 Minuten Beginn schwerer Lähmungserscheinungen (Bewußtlosigkeit, Krämpfe, Seitenlage); das Tier blieb noch 37 Minuten bewußtlos, konstant schwer atmend, in der giftigen Atmosphäre. In frischer Luft rasche Erholung, nach 10 Minuten schon spontane Bewegungen.

Erst bei 0,04 mg sahen wir Vergiftungserscheinungen völlig

---

[1]) Quantitative Studien über die Giftigkeit der Blausäuredämpfe. Inaug.-Diss. Würzburg, 1903.

[2]) Weitere Untersuchungen über die Giftigkeit der Blausäure. Inaug.-Diss. Würzburg, 1905.

ausbleiben. Lehmann, der seine Dosen in Vol.-Prozent Blausäuredampf angibt, bezeichnet 0,03 bis 0,04 ‰ als dauernd unwirksam, 0,05 bis 0,06 ‰ als vergiftend, und bei mehrstündiger Wirkungsdauer als meistens tödlich; dies entspricht etwa 0,04 bis 0,05 mg (unwirksam) und 0,06 bis 0,07 mg als tödlicher Grenze. Die Übereinstimmung dieser Zahlen mit den unseren kann nicht besser sein[1]).

Die Giftigkeit der Blausäure für den Menschen bei Einatmung dürfen wir unbedenklich als die gleiche wie für den Hund und die Katze ansehen; zu dieser Auffassung berechtigen uns Erfahrungen mit Affen.

Bei einem von uns angestellten Versuch wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen im gleichen Raum gleichzeitig ein mittelgroßer malaiischer Makak (Cynomolgus fascicularis), ein Hund (Fox) und eine Katze in einer Gaskammer von 12 cbm Rauminhalt einer Blausäureatmosphäre von 0,14 mg pro Liter Luft ausgesetzt. Sobald der Affe und der Hund völlig gelähmt und bewußtlos waren, wurden sie in frische Luft zurückgebracht, die Katze verblieb noch 7 Minuten lang bewußtlos, aber gleichmäßig atmend in der Blausäureatmosphäre.

Das Ergebnis war wie folgt:

Tierart	Erste Anzeichen der Vergiftung	Erste Anzeichen von Lähmungserscheinungen	Eintritt schwerer allgemeiner Lähmung	Erholung nach Versuchsbeginn
Affe	nach 4 Minuten Gähnen Anzeichen von Nausea, nach 6 Minuten Erbrechen und Husten	nach 8 Minuten sinkt das Tier taumelnd in sich zusammen	nach 12 Minuten Krämpfe, vertiefte Atmung, Seitenlage	nach 19 Minuten verbesserte Atmung, nach 21 Minuten wieder spontane Bewegungen
Hund	nach 3 Minuten Nausea, Würgen, nach 5 Minuten Erbrechen	nach 9 Minuten Ataxie und Taumeln	nach 10 Minuten Krämpfe, schwere Atmung, Seitenlage	Reflexe kehren nach 20 Minuten wieder
Katze	nach 3 Minuten Würgen, nach 5 Minuten Erbrechen	nach 6 Minuten Dyspnoe und Seitenlage	nach 6 bis 7 Minuten	nach 28 Minuten Beginn spontaner Bewegungen

[1]) Vgl. dazu die Bemerkungen von Schankies auf S. 17 seiner Dissertation (Anmerkung), der die Angaben von Lehmann mißverstanden hat.

Alle 3 Tiere erholten sich vollkommen.

Auch ein weiterer analoger Versuch mit einer anderen Affenart (grüne Meerkatze, Cercopithecus sabaeus) zeigte ähnliche gute Übereinstimmung bezüglich des Eintritts und der Art der Vergiftungssymptome bei Hund und Katze.

Danach steht der Affe, wie übrigens auch der Hund, in seiner Empfindlichkeit der Katze sehr nahe und entfernt sich von dem widerstandsfähigeren Kaninchen und erst recht von den kleineren Nagern.

Bemerkung.

Von

M. Biedermann-Jena.

Gegen die von J. Wohlgemuth im 3. und 4. Heft von Bd. 94 der „Biochem. Zeitschr." geübte Kritik an meinen Versuchen erhebe ich Widerspruch und verweise auf meine in kurzem in der „Fermentforschung" erscheinende ausführliche Behandlung dieses Gegenstandes.

Druckfehlerberichtigung.

Zu der Arbeit Salkowski: Bemerkungen zu der Arbeit von Hans Aron „Über den Nährwert".

In Band 94, Seite 209, Zeile 11 von unten
lies statt: „vom 13. V bis 5. IX . . ."
„von 13 bzw. 5, 5, 9 Tagen . . ."

Über die Lichtabsorption neutraler Lösungen von Oxyhämoglobin.

Von

Paul Hári.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 9. April 1919.)

Da spektroskopische und spektrophotometrische Untersuchungen des Blutes nur an ganz klaren Lösungen vorgenommen werden können, ist es üblich geworden, die Verdünnung des Blutes mit einer 0,1 $^0/_0$ igen Lösung von kohlensaurem Natrium vorzunehmen. Da auch krystallisiertes Oxyhämoglobin sich bei Zusatz von kohlensaurem Natrium weit besser als im destillierten Wasser löst, wurde auch die große Mehrzahl der Beobachtungen an Oxyhämoglobin an soda-alkalischen Lösungen desselben ausgeführt.

Nun ist es von vornherein nicht auszuschließen, daß sich die Lichtabsorption des Oxyhämoglobins in soda-alkalischen Lösungen anders als in einer wirklich reinen Lösung in destilliertem Wasser verhält; in der Tat hat Torup[1]) angegeben, daß der Zusatz von kohlensaurem Natrium zu einer Verschiebung der Stelle der stärksten Absorption führt.

Ich habe zur Klärung dieser Frage nachfolgende Untersuchungen vorgenommen.

Aus einer ersten Reihe von Beobachtungen, deren Daten in den nachfolgenden Tabellen I und II zusammengestellt sind, ergab sich zunächst eine weitgehende Übereinstimmung

[1]) Zitiert bei Bohr, Über den spezifischen Sauerstoffgehalt des Blutes. Skandinav. Arch. f. Physiol. 3, 107.

zwischen neutralen und soda-alkalischen Lösungen. [Eine große Reihe von Beobachtungen an letzteren sind in meiner jüngst erschienenen Arbeit publiziert[1]).] Diese Übereinstimmung bestand im folgenden:

a) Der Quotient der Extinktionskoeffizienten — gemessen annähernd genau an den zwei von Hüfner seinerzeit vorgeschlagenen Stellen des Spektrums, und zwar am zweiten Streifen von Grün bei 541,6 — 533,1 $\mu\mu$ und im Zwischenraum zwischen beiden Streifen, bei 565,8 — 555,9 $\mu\mu$ — betrug an 5 neutralen Lösungen (Tabelle I) im Mittelwert annähernd dasselbe, nämlich 1,62, wie seinerzeit von mir an soda-alkalischen Lösungen gefunden wurde, nämlich etwas über 1,60. In einer Reihe weiter unten mitzuteilender Versuche ist die Übereinstimmung eine noch bessere.

Tabelle I.

Untersuchte Lösung	Extinktionskoeffizient		$\frac{(a)}{(b)}$
	in Grün bei 541,6 — 533,1 $\mu\mu$ (a)	im Zwischenraum bei 565,8 — 555,9 $\mu\mu$ (b)	
Hundeblut 25 Lösung 1	0,920	0,560	1,64
Hundehämoglobin 28	0,923	0,583	1,58
Pferdehämoglobin 36	1,004	0,613	1,64
Pferdehämoglobin 37 Lösung 1	0,740	0,459	1,61
Pferdehämoglobin 38 Lösung 6	1,520	0,935	1,63
Mittelwert	—	—	**1,62**

b) An soda-alkalischen Lösungen wurde seinerzeit gefunden, daß dieselben während des Stehens, sogar in der Kälte, an Stärke der Lichtabsorption einbüßen. Dasselbe ist, wie aus Tabelle II hervorgeht, auch an neutralen Lösungen der Fall.

c) In einer weiteren Reihe von Versuchen wurden die spezifischen, auf eine Konzentration von 0,1 $^0/_0$ bezogenen Extinktionskoeffizienten an den beiden genannten Stellen des Spektrums bestimmt, und zwar sowohl in soda-alkalischer, wie auch in rein wäßriger neutraler Lösung des Blutes resp. des

[1]) Beiträge zur Lichtabsorption des Oxyhämoglobins. Diese Zeitschr. 82, 229, 1917.

Tabelle II.

Untersuchte Lösung	Spektralausschnitt a = in Grün bei 511,6 — 533,1 $\mu\mu$ b = im Zwischenraum bei 565,8 — 555,9 $\mu\mu$	Extinktionskoeffizienten nach Fertigstell. der Lösung sofort untersucht	später untersucht
Hundeblut 28 Lösung 1	a	0,730	0,715 [1]
	b	0,457	0,935
Hundehämoglobin 28	a	0,923	0,933 [2]
	b	0,583	0,592
Pferdehämoglobin 37 Lösung 1	a	0,740	0,718 [3]
	b	0,459	0,463
Pferdehämoglobin 38 Lösung 6	a	1,521	1,241 [4]
	b	0,935	0,792
Pferdehämoglobin 39 Lösung 5	a	0,816	0,742 [5]
	b	0,500	0,452

Blutfarbstoffes. Die weitaus größte Zahl dieser Untersuchungen wurde mit dem in meiner bereits zitierten ersten Mitteilung[6]) verwendeten alten Königschen Spektrophotometer, eine geringe Anzahl mit dem nach Martens und Grünbaum modifizierten Apparat ausgeführt, den ich in meiner zweiten Mitteilung[7]) beschrieben habe.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in nachfolgender Tabelle III zusammengestellt.

Von den in Tabelle III zusammengestellten Versuchen sind die letzten drei (Nr. 8 bis 10) von den vorangehenden, (Nr. 1 bis 7), die sich wesentlich anders verhalten, auch räumlich abgetrennt. Zunächst sollen die Versuche 1 bis 7 besprochen werden.

An der überwiegenden Zahl dieser sieben Lösungen fielen die an der neutralen Lösung abgelesenen Exstinktionskoeffizienten etwas geringer aus als an der soda-alkalischen Lösung, und zwar waren sie im Mittelwert aller Fälle am zweiten Absorptionsstreifen von Grün um 1,8 % geringer, im Zwischenraum zwischen beiden Streifen um 1,4 % geringer.

[1]) und [2]) Über Nacht im Eisschrank.
[3]) 24 Stunden im Eisschrank.
[4]) 3 Wochen im Eisschrank.
[5]) 4 Tage im Eisschrank.
[6]) l. c.
[7]) Diese Zeitschr., dieses Heft, 5/6.

Tabelle III.

Nummer des Versuches	Untersuchte Lösung	Hämoglobin-konzentration %	Extinktionskoeffizient in Grün bei 541,6—533,1 μμ (a) alkalisch	neutral	neutral mehr (+) oder weniger (−)	im Zwischenraum zwischen beiden Streifen bei 565,8—555,9 μμ (b) alkalisch	neutral	neutral mehr (+) oder weniger (−)	(a)/(b) alkalisch	(a)/(b) neutral
1[1]	Hundeblut 23 Lösung 1a (alkal.) „ 2 (neutr.)	0,17 0,085	1,468	1,485	+ 1,2	0,893	0,933	+ 4,5	1,64	1,59
2	Hundeblut 28 Lösung 2 (alkal.) „ 1 (neutr.)	0,087	0,740	0,730	− 1,4	0,465	0,457	− 1,7	1,59	1,60
3[1]	Pferdehämoglobin 39 Lösung 2 (alkal.) „ 5 (neutr.)	0,152 0,146	0,856	0,816	− 4,7	0,521	0,500	− 4,0	1,64	1,63
4[1]	Pferdehämoglobin 40 Lösung 3 (alkal.) „ 4 (neutr.)	0,178 0,191	0,837	0,813	− 2,9	0,520	0,515	− 1,0	1,61	1,58
5[2]	Hundehämoglobin 56 Lösung 2a (alkal.) „ 2b (neutr.)	0,0365	0,308	0,300	− 2,7	0,196	0,188	− 4,1	1,57	1,60
6[2]	Pferdehämoglobin 58 Lösung 2a (alkal.) „ 2b (neutr.)	0,0452	0,387	0,379	− 2,1	0,240	0,235	− 7,0	1,61	1,61
7[2]	Pferdehämoglobin 58 Lösung 3a (alkal.) „ 3b (neutr.)	0,0441	0,371	0,381	+ 2,3	0,238	0,235	− 1,3	1,56	1,61
	Mittelwerte	—	—	—	− 1,8	—	—	− 1,4	1,60	1,60
8	Hundeblut 26 Lösung 1 (alkal.) „ 2 (neutr.)	0,080	0,697	0,735	+ 5,4	0,422	0,479	+ 13,5	1,65	1,53
9	Pferdeblut 29 Lösung 1 (alkal.) „ 2 (neutr.)	0,0499	0,430	0,469	+ 8,7	0,262	0,300	+ 16,1	1,64	1,56
10[1]	Pferdehämoglobin 38 Lösung 4 (alkal.) „ 2 (neutr.)	0,168 0,059	0,850	0,765	− 10,8	0,534	0,473	− 11,4	1,59	1,62

[1]) In den so bezeichneten Versuchen, in denen die alkalische und neutrale Lösung nicht von derselben Konzentration waren, wurden die Extinktionskoeffizienten auf dieselbe Konzentration bezogen.

[2]) Diese Versuche wurden mit dem nach Martens und Grünbaum modifizierten Königschen Apparat ausgeführt (alle übrigen mit dem alten Königschen), und zwar an den um ein Geringes abweichenden Spektralstellen 541,4—533,7 und 565,6—556,1 μμ.

In den drei von den übrigen abgetrennten Versuchen 8 bis 10 der Tabelle III sind die Unterschiede zwischen den neutralen und alkalischen Lösungen weit größer, und zwar fiel in zwei Versuchen der Extinktionskoeffizient in der neutralen Lösung größer, in einem der Versuche kleiner aus. Es heißt sicher den Tatsachen keinen Zwang anzutun, wenn ich die Ergebnisse der Versuche 8 bis 10 außer Rechnung lasse, denn es hatte sich in diesen Versuchen um relativ sehr stark verdünnte Farbstofflösungen gehandelt, an denen die mittels des alten Königschen Spektrophotometers erhaltenen Ergebnisse recht unsicher sind[1]). Diese Unsicherheit äußert sich in den Versuchen 8 bis 10 auch in der bedeutenden Divergenz der an den neutralen einerseits und soda-alkalischen Lösungen andererseits aus den Extinktionskoeffizienten berechneten Quotienten, die in den Versuchen 1 bis 7 weit besser übereinstimmen. (Siehe die beiden letzten Stäbe der Tabelle III.)

Ich stehe demnach nicht an, mich bloß an die Ergebnisse der Versuche 1 bis 7 zu halten, aus denen, wie erwähnt, hervorgeht, daß die Extinktionskoeffizienten der neutralen Lösungen im Durchschnitt aller Versuche um 1,8 resp. 1,4 % geringer ausfielen als an den soda-alkalischen Lösungen. Nun ergibt sich noch die Frage, ob wir angesichts dieses geringen Unterschiedes von weniger als 2 %, der den in derartigen Beobachtungen zulässigen Versuchsfehler keinesfalls überschreitet, das Recht haben, zu folgern, daß die Lichtabsorption neutraler Lösungen von Hämoglobin schwächer sei als die der soda-alkalischen Lösung derselben Konzentration?

Ich glaube, daß diese Frage bejaht werden darf, und zwar aus folgenden Gründen: 1. Weil bloß in 3 von 14 Beobachtungen ein umgekehrtes Verhalten — nämlich stärkere Lichtabsorption der neutralen Lösung — zu beobachten war. 2. Weil dasselbe, was im vorangehenden für zwei Spektralausschnitte bewiesen wurde, auch für die benachbarten Spektralbezirke gilt. In nachstehender Tabelle IV sind die an zwei

[1]) Die an noch stärker verdünnten Lösungen ausgeführten Versuche 5, 6 und 7 rangieren nicht hierher, da sie mittels des neuen, modifizierten Königschen Apparates untersucht wurden, an dem — abgesehen von den prinzipiellen Vorteilen — durch Verwendung einer dickeren Flüssigkeitsschicht (längere Röhren) diese Fehlerquelle wegfällt.

neutralen Lösungen von Oxyhämoglobin abgelesenen spezifischen (auf 0,1 $^0/_0$ Hämoglobinkonzentration berechneten) Extinktionskoeffizienten eingetragen und mit dem Mittelwert der Extinktionskoeffizienten verglichen, die von mir an einer größeren Anzahl soda-alkalischer Lösungen an den betreffenden Spektralstellen ausgeführt und seinerzeit mitgeteilt wurden.

Tabelle IV.

Untersuchte neutrale Lösungen	Spektralbereich $\mu\mu$	Spezifische Extinktionskoeffizienten der neutralen Lösung	Durchschnittliche von mir früher gefundene Extinktionskoeffizienten an alkal. Lösungen
Pferdehämoglobin 40 Lösung 4	583,8—573,2	0,725	0,702
Hundehämoglobin 56 Lösung 1 a	580,3—570,5	0,841	0,832
Pferdehämoglobin 40 Lösung 4	571,4—561,2	0,609	0,617
	569,5—559,4	0,573	0,580
	567,6—557,6	0,527	0,534
	566,7—556,7	0,520	0,536
	564,9—554,9	0,512	0,528
	563,9—554,0	0,511	0,513
	562,1—552,0	0,518	0,522
Hundehämoglobin 56 Lösung 1 a	553,4—544,8	0,694	0,683
Pferdehämoglobin 40 Lösung 4	546,4—537,6	0,810	0,847
	544,8—536,1	0,821	0,850
	543,2—534,6	0,821	0,845
	540,0—531,6	0,791	0,805
	538,4—530,1	0,769	0,771

An 15 diesbezüglich untersuchten — im weiteren Bereich des zweiten Streifens und des Zwischenraums zwischen beiden Streifen gelegenen — Stellen des Spektrums sind es wieder nur drei, an denen die Lichtabsorption der neutralen Lösung stärker ausfiel, an allen übrigen Stellen war sie geringer. Es kann sich nach alledem nur um eine Veränderung handeln, die von der Anwesenheit des kohlensauren Alkalis verursacht ist, eine Veränderung, die, wie ich im nachfolgenden ausführen will, dem Methämoglobingehalt der wenn auch frischen und sofort nach ihrer Bereitung untersuchten Oxyhämoglobinlösung zugeschrieben werden muß.

Es betragen nämlich die spezifischen (auf eine Konzentration von 0,1 $^0/_0$ berechneten) Extinktionskoeffizienten

	bei 541,6—533,1 $\mu\mu$	bei 565,8—555,9 $\mu\mu$
für Oxyhämoglobin (soda-alkalisch) .	0,841	0,523
„ Methämoglobin[1]) (soda-alkalisch)	0,576	0,470
„ Methämoglobin[1]) (neutral) . .	0,356	0,215

Da die Extinktionskoeffizienten des Methämoglobins — ob in neutraler oder in soda-alkalischer Lösung befindlich — wesentlich geringer sind als die des Oxyhämoglobins, müssen die Extinktionskoeffizienten einer Lösung von Oxyhämoglobin, die Methämoglobin enthält — wie längst bekannt — an beiden Spektralstellen heruntergedrückt werden. Da ferner die Extinktionskoeffizienten der neutralen Methämoglobinlösung an den genannten Spektralstellen noch um ein Bedeutendes geringer sind als die einer soda-alkalischen Methämoglobinlösung, werden die Extinktionskoeffizienten einer durch Methämoglobin verunreinigten Lösung von Oxyhämoglobin nicht gleich stark herabgedrückt werden, ob die Lösung eine soda-alkalische oder eine rein wäßrige ist; vielmehr wird der Abfall in der neutralen Lösung bedeutender sein.

Es läßt sich sehr leicht berechnen, daß es der Beimischung einer nur geringen Menge von Methämoglobin bedarf, die sich auf nicht mehr als einige Prozente des anwesenden Oxyhämoglobins belaufen muß, um die von mir gefundene schwächere Lichtabsorption der neutralen Lösung zu verursachen. (Allerdings ergibt diese Berechnung auch, daß die Verringerung im Zwischenraume stärker als am zweiten Streifen sein müßte, was in meinen Versuchen nicht der Fall war.)

Ein weiterer Beweis für die Anwesenheit geringer Mengen von Methämoglobin in den von mir seinerzeit und jetzt untersuchten Lösungen des vermeintlich reinen Oxyhämoglobins ergibt sich aus folgender Betrachtung.

Durch eine neutrale Lösung von Methämoglobin wird, wie bekannt, und wie in der bereits angekündigten späteren Abhandlung noch ausführlich gezeigt werden soll, das Licht vom roten Spektralende angefangen bis etwa zur Wellenlänge 617 $\mu\mu$ weit **stärker** absorbiert als durch eine soda-alkalische Lösung von Methämoglobin. Es verhalten sich daher die neutralen und

[1]) Siehe eine demnächst mitzuteilende Arbeit in dieser Zeitschrift.

soda-alkalischen Lösungen von Methämoglobin in diesen Spektralgebieten entgegengesetzt, als in dem oben behandelten Gebiet (dem des zweiten Streifens und des Zwischenraums). Ist dem aber so, so muß die Lichtabsorption derselben neutralen Lösungen vom Oxyhämoglobin, die im Gebiete der Streifen schwächer als der soda-alkalischen ausfiel, am roten Ende — eben infolge ihres Methämoglobingehaltes — stärker als die der soda-alkalischen sein.

Daß dies in der Tat der Fall ist, geht aus den Daten der nachfolgenden Tabelle V hervor.

Tabelle V.

	Spezifische Extinktionskoeffizienten $\times 10^4$									
	Soda-alkalische Lösungen						neutrale Lösungen			
	c = 0,038 %	c = 1,47 %	c = 3,36 %	c = 1,10 %	c = 3,56 %		c = 2,95 %	c = 1,90 %	c = 3,83 %	c = 0,03 %
μμ[1])	Pferde-hämoglobin 35, Lösung 1	Pferde-hämoglobin 37, Lösung 2	Pferde-hämoglobin 38, Lösung 3	Pferde-hämoglobin 39, Lösung 1	Pferde-hämoglobin 40, Lösung 1	Mittelwert aus allen alkalisch. Lösungen	Pferde-hämoglobin 38, Lösung 1	Pferde-hämoglobin 38, Lösung 5	Pferde-hämoglobin 40, Lösung 2	Pferde-hämoglobin 56, Lösung 1a
648,8	52,8	52,0	54,5	—	—	**53,1**	217	307	137	—
641,7	53,9	—	—	—	64,5	**59,2**	323	—	191	—
635,0	54,6	67,8	74,3	76,8	75,3	**70,0**	366	482	216	—
628,3	71,9	—	—	85,7	97,7	**83,4**	—	—	242	—
625,5	92,7	—	—	84,7	—	**88,7**	—	—	—	**316**
622,0	119,0	112,0	115,0	108,0	117,0	**116,0**	401	540	257	—
615,7	166,0	—	—	—	150,0	**150,0**	—	—	284	—
614,5	191,0	151,0	166,0	155,0	—	**166,0**	401	534	—	—
609,8	268,0	—	—	211,0	212,0	**245,0**	—	—	322	—
607,5	296,0	242,0	252,0	236,0	—	**256,0**	442	583	—	—
606,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**510**
602,9	429,0	357,0	331,0	334,0	314,0	**353,0**	519	649	—	—

Aus den Werten der soda-alkalischen Oxyhämoglobinlösungen, die großenteils bereits in meiner zitierten ersten Arbeit mitgeteilt waren, konnte bei ihrer leidlichen Übereinstimmung ein Mittelwert gezogen werden; nicht so an den verschiedenen neutralen Lösungen, deren entsprechende Werte stark divergieren. Immerhin geht aus dem Vergleich der mitgeteilten Daten hervor, daß die Lichtabsorption neutraler

[1]) Diese Zahlen bedeuten die Wellenlängen der Strahlen, die die Mitte des Spektralausschnittes eingenommen haben.

Lösungen von vermeintlich reinem Oxyhämoglobin am roten Ende des Spektrums — eben infolge ihres Methämoglobingehalts — größer ist als die der soda-alkalischen Lösung. (Warum in meinen Versuchen die Lichtabsorption noch über die Stelle von 617 $\mu\mu$ violettwärts stärker war als die der soda-alkalischen, kann ich mir vorläufig nicht erklären.)

Die Ergebnisse obiger Versuche kann ich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Lichtabsorption neutraler Lösungen von Blut oder von Oxyhämoglobin unterscheidet sich nur sehr wenig von der der soda-alkalischen Lösungen.

2. Der Unterschied ist der Beimischung geringer Mengen von Methämoglobin zuzuschreiben.

Ist das Absorptionsverhältnis (Vierordt) ein von der Art des verwendeten Apparats (Spektrophotometer) unabhängiger, charakteristischer Wert?

Von

Paul Hári.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 9. April 1919.)

In einer vorangehenden Arbeit[1]) über die Lichtabsorption des Oxyhämoglobins habe ich bezüglich der an einer und derselben Farbstofflösung mittels verschiedener Apparate zu erwartenden Werte folgendes ausgeführt[2]):

„Es ist von verschiedenen Autoren mehr oder minder stark betont worden, daß die für das Absorptionsverhältnis erhaltenen Werte auch von der Art des verwendeten Spektrophotometers abhängen. So behauptet Gallerani[3]) direkt, daß das Absorptionsverhältnis für jeden Apparat eigens bestimmt werden muß; sogar Butterfield sagt[4]), daß . . . ‚*A* nicht notwendig den gleichen Wert bei jedem Apparat zu haben braucht‘. Würde sich das bewahrheiten, so würde die Spektrophotometrie prinzipiell und auch methodisch recht wenig Vertrauen verdienen.“

---

[1]) Beiträge zur Lichtabsorption des Oxyhämoglobins. Diese Zeitschr. **82**, 229, 1917.

[2]) S. 261.

[3]) G. Gallerani, Sur la nature et les variantes du rapport d'absorption spectrophotométrique de l'oxyhémoglobine etc. Arch. ital. de biologie **37**, 20, 1902.

[4]) E. E. Butterfield, Über die Lichtextinktion, das Gasbindungsvermögen und den Eisengehalt des menschlichen Blutfarbstoffs in normalen und krankhaften Zuständen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**, 192.

Daß diese Befürchtung unbegründet ist, soll im nachstehenden gezeigt werden.

Noch während der Kriegsdauer bin ich in den Besitz eines nach Martens und Grünbaum[1]) verbesserten Königschen Spektrophotometers gelangt und habe an mehreren Blut- und Hämoglobinlösungen vergleichende Untersuchungen mittels des alten (in der ersten Mitteilung benutzten) und des neuen Königschen Apparates (große Beleuchtungsvorrichtung) ausgeführt.

Diesen Versuchen ging selbstverständlich eine genaue Justierung und eine möglichst genaue Eichung des neuen Apparates voran; letztere wurde, da der Apparat auch zu Untersuchungen in verschiedenen Spektralreihen benutzt werden sollte, an möglichst vielen Stellen mittels Funken- resp. Flammenspektren vorgenommen.

Tabelle I.

$\mu\mu$	Orientierungs-Skala	$\mu\mu$	Orientierungs-Skala	$\mu\mu$	Orientierungs-Skala
Pb 438,7	2735	Cd 508,6	3811	Pb 560,8	4295
Cd 441,3	2793	Cu 510,6	3831	Sn 579,9	4432
He 447,2	2904	Cu 515,3	3883	He 587,6	4482
Mg 448,1	2923	Mg 517,5	3908	Na 589,3	4493
Sr 460,8	3150	Ag 520,9	3941	Tl 594,9	4530
Cd 467,8	3267	Cu 521,8	3950	Sr 605,5	4593
He 471,3	3320	Cd 533,8	4067	Zn 610,3	4620
Zn 472,2	3335	Tl 535,1	4079	Sb 613,0	4635
Cd 480,0	3450	Tl 537,3	4098	Zn 636,4	4755
Zn 481,1	3464	Cd 537,9	4105	Cd 643,8	4791
H 486,6	3534	Hg 546,1	4176	Sn 645,3	4797
He 492,1	3613	Ag 546,6	4179	H 656,3	4846
Zn 492,5	3617	Sb 556,9	4263	He 667,8	4894
He 501,6	3728	Sn 557,6	4269		

Die Wellenlängen wurden auf die Ordinaten, — die Werte der Orientierungsskala auf die Abszissenachse aufgetragen und die resultierenden meist dicht benachbarten Punkte zu einer Kurve vereinigt.

[1]) F. F. Martens, Über eine Neukonstruktion des Königschen Spektrophotometers. Verhdl. d. Deutsch. physikal. Ges. 1, 1899. — F. F. Martens und F. Grünbaum, Über eine Neukonstruktion des Königschen Spektrophotometers. Annal. d. Physik, 4. Folge, 12, 1903.

Zum Überfluß habe ich noch einige von Martens und Grünbaum angegebene Probebestimmungen an Lösungen von doppelt-chromsaurem Kalium bekannter Konzentration bei Thalliumfunken als Lichtquelle ($\lambda = 535{,}1\ \mu\mu$) vorgenommen.

Da es mir mangels einer entsprechenden Einrichtung nicht glückte, das Licht für die Dauer eines Versuches in ganz gleichmäßiger Intensität zu erhalten, mußte ich die teilweile sehr bedeutenden Unterschiede zwischen den Einzelbestimmungen wohl oder übel hinnehmen. Die sehr annehmbare Übereinstimmung der Mittelwerte, die nur um -1, resp. $+2\,^0/_0$ vom Martens und Grünbaumschen abweichen, liefern jedoch eine Gewähr für die Exaktheit der Justierung und Kalibrierung.

Tabelle II.

Nr.	Konzentration der Lösung n/	Extinktions-Koeffizient nach Martens und Grünbaum	Extinktions-Koeffizient von mir gefunden	
1.	0,01396	0,129	0,121	Mittelwert **0,128**
2.	0,01396	0,129	0,136	
3.	0,01396	0,129	0,127	
4.	0,01698	0,157	0,165	Mittelwert **0,160**
5.	0,01698	0,157	0,159	
6.	0,01698	0,157	0,155	
7.	0,01698	0,157	0,162	

Den Okularspalt habe ich so eingestellt, daß seine Breite möglichst genau der in der ersten Mitteilung am alten Apparat verwendeten Okularspaltbreite entspreche. Angesichts des Umstandes, daß, wie an dem alten, so auch am neuen, von Schmidt und Haensch gelieferten Apparat, an dem Okularspalt keine Meßtrommel angebracht ist, bereitete dies gewisse Schwierigkeiten und hatte die allerdings sehr geringe Abweichung zur Folge, daß die Spaltbreite

am alten Apparat	541,6 bis 533,1	resp.	565,8 bis 555,9 $\mu\mu$
" neuen "	541,4 " 533,7	"	565,6 " 556,1 "

betragen hatte.

Der Eintrittspalt wurde genau wie am alten Apparat auf 0,1 mm eingestellt.

Als Lichtquelle wurde Gasglühlicht verwendet.

Beschreibung der Versuche. In einer ersten Reihe

von Versuchen wurde der Extinktionskoeffizient an soda-alkalischen Blut- resp. Hämoglobinlösungen an den beiden genannten Stellen, an denen ich auch mit dem alten Apparat gearbeitet hatte, bestimmt. In nachfolgender Tabelle III sind die betreffenden Daten zusammengestellt.

Tabelle III.

Nr.	Untersuchte Lösung	Extinktionskoeffizienten in Grün bei 541,4—533,7 $\mu\mu$ (*A*)		Extinktionskoeffizienten in Zwischenräumen zwischen beiden Streifen bei 565,6—556,1 $\mu\mu$ (*B*)		$\frac{A}{B}$	
		sofort[1]	später[2]	sofort	später	sofort	später
1.	Pferdeblutkörperchen Nr 46	—	0,498	—	0,314	—	1,584
2.	Pferdehämoglobin Nr. 47	—	0,685	—	0,437	—	1,569
3.	„ Nr. 48	0,549	—	0,341	—	1,609	—
4.	Hundehämoglobin Nr. 49; Lösung 1	0,465	—	0,292	—	1,590	—
5.	Pferdehämoglobin Nr. 50; Lösung 2	0,396	—	0,248	—	1,596	—
6.	Hundehämoglobin Nr. 51; Lösung 1	0,521	—	0,324	—	1,607	—
7.	Pferdeblut Nr. 52; Lösung 2a	—	0,640	—	0,403	—	1,588
8.	Pferdeblut Nr. 53; Lösung 3	—	0,251	—	0,160	—	1,572
9.	Pferdeblut Nr. 54	—	0,447	—	0,289	—	1,594
10.	Hundeblut Nr. 55; Lösung 2	—	0,869	—	0,550	—	1,574
11.	Hundehämoglobin Nr. 55; Lösung 1a	0,667	—	0,424	—	1,599	—
12.	Dasselbe; Lösung 2a . . .	0,397	—	0,250	—	1,588	—
13.	Pferdehämoglobin Nr. 58; Lösung 1	0,370	—	0,232	—	1,595	—
14.	Dasselbe; Lösung 2b . . .	0,387	—	0,240	—	1,612	—
15.	Dasselbe; Lösung 3b . . .	0,371	—	0,238	—	1,561	—
					Mittelwerte:	**1,595**	**1,572**

In meiner ersten Mitteilung habe ich an einer größeren Reihe von Versuchen den Erweis erbracht, daß der Quotient der Absorptionsverhältnisse (*A* im Zwischenraum : *A* am zweiten Streifen) resp. der diesem Quotienten gleiche Ausdruck Extinktionskoeffizient am zweiten Streifen : Extinktionskoeffizient im Zwischenraum den konstanten Wert von etwas über 1,60 be-

[1]) „Sofort" soll heißen: sofort nach Bereitung der Lösung untersucht.

[2]) „Später" soll heißen: mehrere bis 24 Stunden nach Bereitung der Lösung untersucht.

sitzt, sofern wirklich an frischen, sofort nach ihrer Bereitung untersuchten Lösungen gearbeitet wird; hingegen erhält man die von Hüfner gefundene etwas niedrigere Zahl von etwa 1,58, wenn man die soda-alkalische Lösung nicht „sofort“, sondern „später“ innerhalb der ersten 24 Stunden nach ihrer Bereitung untersucht.

Dasselbe war in den hier untersuchten, in Tabelle III zusammengestellten Versuchen der Fall: an den sofort untersuchten Lösungen betrug der Wert des Quotienten (Extinktionskoeffizient in Grün : Extinktionskoeffizient im Zwischenraum) 1,595, an den später untersuchten 1,572, also annähernd genau dasselbe, was am alten Apparate erhalten wurde.

In einer anderen Reihe von Versuchen wurde festzustellen gesucht, ob die Extinktionskoeffizienten an einer und derselben Farbstofflösung einmal mit dem neuen, einmal mit dem alten Apparat bestimmt, den gleichen oder aber einen verschiedenen Wert aufweisen. Die vergleichenden Ablesungen wurden teils an soda-alkalischen Blutlösungen, teils an Lösungen von Oxyhämoglobin resp. einmal am Methämoglobin angestellt; wobei es hier natürlich nicht darauf ankam, ob die Lösung frisch war oder bereits einige Tage gestanden hatte.

Die Ergebnisse dieser Ablesungen sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Nr.	Untersuchte Lösung	Extinktionskoeffizienten			
		am 2. Streifen (in Grün)		im Zwischenraum zwischen beiden Streifen	
		alter Apparat bei 541,6—553,1	neuer Apparat bei 541,4—533,7	alter Apparat bei 565,8—555,9	neuer Apparat bei 565,6—556,1
1.	Pferdeblutkörperchenlösung Nr. 46	0,482	0,498	0,304	0,314
2.	Pferdehämoglobin Nr. 47	0,703	0,685	0,460	0,437
3.	Pferdemethämoglobin Nr. 50; Lösung 5 . .	0,555	0,561	0,460	0,454
4.	Hundehämoglobin Nr. 51 Lösung 1	0,531	0,521	0,326	0,324
5.	Pferdeblutlösung Nr. 54	0,450	0,447	0,296	0,289

Die Ablesungen mit dem neuen Apparat fielen größer (+) resp. kleiner (—) aus:

in Versuch	in Grün	im Zwischenraum
1	+ 3,3 %	+ 3,2 %
2	— 2,6 „	— 5,0 „
3	+ 1,1 „	— 1,3 „
4	— 2,1 „	— 0,6 „
5	— 0,7 „	+ 2,4 „
Mittelwerte:	— 1,0 %	— 1,3 %

Diese beinahe vollständige Übereinstimmung zwischen den beiden abweichend konstruierten Apparaten läßt folgern, daß die für das Absorptionsverhältnis erhaltenen Zahlen als für den betreffenden Spektralausschnitt eindeutig charakteristische, absolute Werte anzusehen sind, die von der Art des benutzten Apparats unabhängig sind, sofern nur diese Apparate richtig konstruiert und genau justiert resp. kalibriert sind und bei derselben Okular- und Eintrittsbreite abgelesen wird.

Untersuchungen über die Wärmetönung von Enzymreaktionen.

V. Mitteilung.

Über die Wärmetönung der Organautolyse.

Von

Klara Kornfeld und Heinrich Lax.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 9. April 1919.)

In einer Reihe vorangehender Mitteilungen[1]) wurde ermittelt, daß die Trypsinverdauung des Eiweißes ohne nachweisbare Wärmetönung, hingegen die Salzsäurepepsinverdauung des Eiweißes exothermal verläuft. Es war daher von Interesse, zu erfahren, wie sich diesbezüglich die Autolyse, die namentlich an der Leber den Gegenstand vielfacher Untersuchungen abgab, verhält.

In diesen Versuchen haben wir dieselbe Methodik verwendet, die in den erwähnten Mitteilungen ausführlich beschrieben wurde; sie sei weiter unten kurz geschildert. Das Prinzip dieser Methodik besteht darin, daß der Energiegehalt des fraglichen Gemisches (hier des Leberbreies) in einer Portion ohne vorangehende Autolyse bestimmt und mit dem Energie-

---

[1]) Franz Tangl, Untersuchungen über die Wärmetönung von Enzymreaktionen. Arch. f. d. ges. Physiol. 115, 1. — Roland v. Lengyel, Einige Versuche über Wärmetönung der Pepsinverdauung des Eiweißes. Arch. f. d. ges. Physiol. 115, 7. — Paul Hári, Über die Wärmetönung der Trypsinverdauung des Eiweißes. Arch. f. d. ges. Physiol. 115, 11. — Derselbe, Über die Wärmetönung der Pepsinverdauung des Eiweißes. Arch. f. d. ges. Physiol. 121, 459, 1908.

gehalt einer zweiten Portion verglichen wird, die vorher der Autolyse überlassen war.

Wenn es sich dann erweist, daß der Energiegehalt in dem ohne — und nach erfolgter Autolyse untersuchten Brei gleich groß ist, dann ist die Wärmetönung der Autolyse gleich Null; ist der Energiegehalt des autolysierten Breies kleiner, resp. größer als der des nicht autolysierten, so ist eben der autolytische Zerfall ein exo- resp. endothermaler Vorgang.

Durch vergleichende Bestimmung des N- resp. auch des Trockensubstanzgehaltes war auch Aufschluß einerseits über einen etwaigen N-Verlust, andererseits über den Umfang der die Autolyse eventuell begleitenden Hydrolyse zu erwarten.

Versuchsmethodik.

Ganz frisch dem Tiere entnommene Leber wurde zunächst von den zuführenden Gefäßen aus mit $1^1/_2$ bis 2 l destillierten Wassers blutleer gespült, sodann in der Fleischmühle zerkleinert, durch ein engmaschiges Sieb gedrückt; der feinkörnige Brei wurde zu den weiteren Versuchen verwendet. Ein Teil dieses Breies wurde sofort eingedampft und im lufttrockenen Rückstand die entsprechenden Bestimmungen vorgenommen. Ein anderer Teil des Breies wurde nach Salkowskis[1]) Vorschrift mit dem 10fachen Volumen Chloroformwassers versetzt, in größere, mit eingeschliffenen Glasstöpseln versehene Erlenmeyersche Kolben gefüllt und im Thermostaten der Autolyse bei 37 bis 40° überlassen. Bei der nachgewiesenen Verzögerung der Autolyse durch mitanwesendes Chloroform wäre es erwünscht gewesen, bloß aseptisch, ohne jedweden Zusatz eines Antisepticums vorzugehen; doch zwangen uns die dabei sich ergebenden technischen Schwierigkeiten hiervon abzusehen.

Über den Fortgang der Autolyse haben wir uns in einigen eigens zu diesem Zwecke aufgestellten Kontrollversuchen überzeugt, und zwar so, daß wir einzelne Portionen des mit Chloroformwasser beschickten Breies warmstellten (in einem Thermostaten), einige andere Portionen kaltstellten (im Eisschrank) und nach einiger Zeit je eine warm- resp. kaltgehaltene Portion vergleichsweise auf koaguliertes Eiweiß untersuchten. Die Ab-

[1]) Salkowski, Bemerkungen über Autolyse und Konservierung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 136, 1909.

nahme desselben konnte als Maß der fortschreitenden autolytischen Zersetzung gelten. So betrug z. B. in einer Versuchsreihe nach 18tägiger Versuchsdauer

	der koagulable N %	der nicht koagulable N %
in dem kaltgehaltenen Leberbrei	0,52	0,11
in dem warmgehaltenen „	0,14	0,47

Auch haben wir uns von Zeit zu Zeit durch Impfen auf Agar davon überzeugt, daß ein Zersetzen durch Bakterien in der Autolysenflüssigkeit nicht stattfand.

Sowohl in dem frischen Leberbrei als auch in dem — ohne vorangehende Autolyse oder nach erfolgter Autolyse am Wasserbad eingedampften Leberbrei — wurde der Gehalt an Trockensubstanz, an Stickstoff und an chemischer Energie bestimmt.

Die Trockensubstanzbestimmung erfolgte in kleinen Wägegläschen mit eingeschliffenen Glasstöpseln; die N-Bestimmung nach Kjeldahl mit metallischem Hg als Katalysator; die Bestimmung der chemischen Energie in einer modifizierten Berthelot-Mahlerschen Bombe. Zu jeder Bestimmung dienten 2 bis 3 Parallelanalysen, im Falle schlechter Übereinstimmung deren auch mehr. Die Bestimmungen am eingedampften Leberbrei wurden folgendermaßen vorgenommen: der zu untersuchende Brei wurde in große, vorher auf 0,01 g genau gewogene Porzellanschalen gegossen und am Wasserbad eingedampft, wieder genau abgewogen, jedoch erst nachdem die Schale offen — bloß vor Staub geschützt — 24 Stunden lang im Zimmer gestanden hatte. Auf diese Weise erhielten wir eine lufttrockene Substanz von bekanntem Gewicht, von der nicht zu befürchten war, daß sie während der nachfolgenden Manipulationen (wie Auskratzen aus der Schale, Zerreiben zu einem feinen und gleichmäßigen Pulver, Abwägen in kleine Portionen zu den Analysen) Wasser anziehe oder verlöre.

Soferne von der oben beschriebenen Methodik Abweichungen stattfanden, soll dies an den betreffenden Stellen vermerkt werden.

Beschreibung der Versuche.

Versuchsreihe I. Die frischen, zwei eben getöteten Hunden entnommenen Lebern wurden nach der beschriebenen Methodik behaneldt,

jedoch mit dem Unterschied, daß hier die Bestimmungen am frischen Leberbrei wegfielen und nur an dem ohne und nach erfolgter Autolyse eingedampften Leberbrei vorgenommen wurden. In Versuch 1 und 2 betrug die Autolysendauer 2 Wochen, in Versuch 3 und 4 4 Wochen.

Die Analysenbelege und Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind aus nachfolgenden Tabellen zu ersehen:

Tabelle I.

Analyse des zu den Autolyseversuchen verwendeten Leberbreies

feucht	nach dem Eindampfen	
Trockengehalt %	N-Gehalt der Trockensubstanz %	Energiegehalt pro 1 g Trockensubstanz g-Cal
10,62	14,43	6594

Tabelle II.

Zur Autolyse aufgestellter Leberbrei

Versuchsreihe	Versuchs-Nr.	vor der Autolyse (berechnet aus Tab. I)				nach erfolgter Autolyse (bestimmt)						
		feucht gewogen	Trockengehalt	N in der Trockensubstanz	Energiegehalt der Trockensubstanz	lufttrocken		Trockensubstanz	N in der Trockensubstanz		Energiegehalt der Trockensubstanz	
							Trockengehalt				pro 1 g	i. ganzen
		g	g	g	kg-Cal	g	%	g	%	g	g-Cal	kg-Cal
I	1	55,07	5,85	0,84	38,58	6,02	85,96	5,17	?	?	6611	34,21
	2	51,45	5,46	0,79	36,03	5,95	87,07	5,18	10·23	0,52	6408	33,20
	3	38,93	4,13	0,59	27,26	4,62	84,03	3,88	15,37	0,60	6671	25,90
	4	56,86	6,04	0,87	39,82	6,85	83,24	5,70	?	?	6676	38,07

Tabelle III.

Unterschied zwischen dem ohne Autolyse und nach erfolgter Autolyse eingedampften Leberbrei (berechnet aus Tabelle II)

Versuchsreihe	Versuchs-Nr.	Im Trockensubstanzgehalt		Im N-Gehalt		Im Energiegehalt	
		g	%	g	%	kg-Cal	%
I	1	— 0,68	— 11,6	?	?	— 4,37	— 11–13
	2	— 0,28	— 5,2	— 0,27	— 34,2	— 2,83	— 7,8
	3	— 0,25	— 6,1	+ 0,01	+ 1,7	— 1,36	— 4,9
	4	— 0,34	— 5,6	?	?	— 1,75	— 4,4

Das wesentlichste Ergebnis dieser Versuche ist ein relativ bedeutender, 4,4 bis 11,3 % betragender Energieverlust des autolysierten Leberbreies in allen 4 Versuchen, welcher Verlust weit größer ist, als es den zulässigen und unvermeidlichen Versuchsfehlern entspricht. Aus diesem

Verlust auf eine positive Wärmetönung des Autolysenvorganges zu schließen, haben wir jedoch um so weniger das Recht, da ja demselben ein beinahe gleicher, 5,6 bis 11,6 % betragender Verlust an Trockensubstanz — offenbar an flüchtigen Bestandteilen — gegenübersteht. Durch diesen Substanzverlust ist der Verlust an chemischer Energie genügend begründet, wenn man annimmt — was hier zunächst gestattet sein soll —, daß die in 1 g enthaltene Energiemenge der verlorenen (verflüchtigten) Bestandteile dem der übrigen Trockensubstanz gleich sei. Welcher Natur die durch Verflüchtigung verlorenen Bestandteile resp. Zersetzungsprodukte sind, geht bereits aus den Untersuchungen von Magnus-Levy[1]) hervor, der gefunden hat, daß sich während der Autolyse nebst nichtflüchtigen Stoffen auch flüchtige Säuren, wie Kohlensäure, Essig-, Milch-, Bernsteinsäure usw. bilden. Es ist also als sehr plausibel anzunehmen, daß die genannten, chemische Energie enthaltenden Zersetzungsprodukte sich teilweise bereits während der Autolyse, besonders leicht und ausgiebig jedoch während der der Energiebestimmung vorausgehenden Eindampfung ich verflüchtigen und so den besprochenen Ausfall an Energiegehalt bewirken. — Über den N-Verlust des Leberbreies resp. über den N-Gehalt der verflüchtigten Substanzen sollten uns eigentlich die ebenfalls in Tabelle III zusammengestellten Daten Aufschluß geben. Leider sind aber dieselben durch eine Häufung von Fehlanalysen und Unstimmigkeiten zu diesem Aufschluß nicht geeignet.

Versuchsreihe II und III. Das Entweichen flüchtiger Bestandteile resp. dadurch bedingter Verlust an Trockensubstanz in Versuchsreihe I, der eine etwaige davon unabhängige Veränderung im Energiegehalt des eingedampften Leberbreies verdecken konnte, war durch die ange Dauer (24 Stunden) des Eindampfungsprozesses sehr gefördert Aus diesem Grunde haben wir in den nun zu besprechenden Versuchsreihen II und III das Eindampfen durch Steigerung der Eindampfungstemperatur auf 90 bis 95° (in Versuchsreihe I betrug sie 80 bis 90°) wesentlich, auf etwa 12 Stunden, abgekürzt.

Ein weiterer Mangel der Versuchsreihe I bestand darin, daß aus den dort beschriebenen Versuchen nicht zu ersehen war, ob die Verdampfung allein, also unabhängig von dem Autolysenvorgang, zu einer Veränderung im Trockensubstanz- und N-Gehalt führte. Auch diesem Mangel wurde in den Versuchsreihen II und III abzuhelfen gesucht, und zwar dadurch, daß einerseits die N-Bestimmungen auch am frischen Leberbrei ausgeführt wurden, wo also jedweder Verlust ausgeschlossen war, andererseits der Trockensubstanzgehalt des frischen Leberbreies an ganz geringen Mengen desselben bestimmt wurde, die sehr rasch eintrockneten, wodurch ein etwaiger Verlust auf ein Minimum reduziert wurde.

---

[1]) Magnus-Levy, Über die Säurebildung bei der Autolyse der Leber. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 261, 1903.

Die Ergebnisse dieser beiden Versuchsreihen sind aus nachfolgenden Tabellen IV bis VI zu ersehen.

Tabelle IV.

Versuchsreihe	Versuchs-Nr.	Analyse des zu den Autolysenversuchen verwendeten Leberbreies: feucht (A)					nach dem Eindampfen (B)						
			Trockengehalt		Nitrogen			Trockengehalt		N in der Trockensubstanz		Energiegehalt pro 1 g Trockensubstanz	
		g	%	g	%	g	g	%	g	%	g	g-Cal.	
II	5	265,10	24,81	65,77	2,79	7,39	70,26	92,55	65,03	10,97	7,14	5748	
	6	266,11	24,81	66,02	2,79	7,42	70,75	91,93	65,04	10,78	7,01	5748	
III	9	40,28	25,22	10,16	2,25	0,91	10,73	95,11	10,20	9,12	0,93	5460	Mittelwert
	10	34,29	25,22	8,65	2,25	0,77	9,23	95,48	8,81	8,93	0,79	5435	5447

Tabelle V.

Versuchsreihe	Versuchs-Nr.	Zur Analyse aufgestellter Leberbrei: vor der Autolyse [C] (berechnet aus Tabelle IV)				nach erfolgter Autolyse eingedampft [D] (bestimmt)						
		feucht gewogen	Trockensubstanz	N in der feuchten Substanz	Energiegehalt der Trockensubstanz	lufttrocken	Trokkengehalt	Trockensubstanz	N in der Trockensubstanz		Energiegehalt d. Trockensubstanz pro 1 g	im ganzen
		g	g	g	kg-Cal	g	%	g	%	g	kg-Cal	kg-Cal
II	7	121,66	30,18	3,39	173,50	33,88	85,89	29,10	11,32	3,29	5958	173,38
	8	99,98	24,80	2,78	142,55	25,68	89,13	23,87	11,79	2,69	5943	136,03
III	11	38,29	9,66	0,86	52,62	10,39	93,53	9,72(?)	8,39	0,82	5326	51,70
	12	50,67	12,78	1,14	69,61	13,66	92,85	12,68	8,50	1,08	5340	67,73

Tabelle VI.

Versuchsreihe	Versuchs-Nr.	Unterschied zwischen frischem und ohne Autolyse eingedampftem Leberbrei; im letzteren mehr (+) oder weniger (—) (A—B): im Trockengehalt		im N-Gehalt		Versuchs-Nr.	frischem und nach erfolgter Autolyse eingedampftem Leberbrei; im letzteren mehr (+) oder weniger (—) (C—D): im Trockengehalt		im N-Gehalt		Versuchs-Nr.	ohne Autolyse und nach Autolyse eingedampftem Leberbrei; im letzteren mehr (+) oder weniger (—) (C—D): im Energiegehalt	
		g	%	g	%		g	%	g	%		kg-Cal	%
II	5	— 0,79	— 1,1	— 0,25	— 3,4	7	— 1,08	— 3,6	— 0,10	— 2,9	7	— 0,12	— 0,1
	6	— 0,98	— 1,5	— 0,41	— 5,5	8	— 0,93	— 3,7	— 0,09	— 3,3	8	— 6,52	— 4,6
III	9	+ 0,04	+ 0,4	+ 0,02	+ 2,1	11	+ 0,06(?)	+ 0,5(?)	— 0,04	— 4,5	11	— 0,92	— 1,7
	10	+ 0,16	+ 1,8	+ 0,02	+ 2,5	12	— 0,10	— 0,8	— 0,06	— 5,3	12	— 1,88	— 2,7

Ehe wir darangehen, aus den Ergebnissen der Tabelle VI Schlüsse auf die Reaktionswärme des Autolysenvorganges zu ziehen, sollen zunächst die Veränderungen besprochen werden, die im Leberbrei durch das Eindampfen allein (ohne vorangehende Autolyse) verursacht wurden (Versuche 5, 6, 9 und 10 in Tabelle VI).

Der Trockensubstanzgehalt zeigt in beiden Versuchen (5 und 6) der Versuchsreihe II eine deutliche Abnahme, die jedenfalls größer ist als dem zulässigen Versuchsfehler entspricht; dies spricht dafür, daß der Verlust an flüchtigen Bestandteilen größer ist als der etwaige aus der Hydrolyse entstehende Zuwachs. Der gleichzeitige nicht unbedeutende N-Verlust zeugt dafür, daß sich auch unter den verflüchtigten Produkten N-haltige in relativ bedeutender Menge befunden hatten.

Anders gestalteten sich diese Verhältnisse in Versuchsreihe III, in deren beiden Versuchen (9 und 10) eine geringe Zunahme der Trockensubstanz statthatte, aus der geschlossen werden könnte, daß hier der Verlust an verflüchtigten Substanzen durch die Hydrolyse maskiert bzw. überkompensiert wurde. (Eine der Hydrolyse entsprechende intramolekulare Wasseraufnahme könnte ja mit der während des Eindampfens des Leberbreies erfolgenden Koagulation der Eiweißkörper einhergehen.) Diese Annahme verliert jedoch jede Berechtigung, wenn man die im N-Gehalt eingetretene Veränderung in Betracht zieht. Dieser zeigt nämlich ebenfalls eine geringe Zunahme, woraus nun gefolgert werden kann, daß hier ein gemeinsamer Analysenfehler (beim Abwägen des feuchten oder eingedampften Leberbreies) vorliegt, der einerseits die noch immerhin mögliche Zunahme der Trockensubstanz, andrerseits jedoch die ganz unmögliche Zunahme des N-Gehaltes ergab.

Bei diesem Stand der Dinge können wir uns bezüglich dieser Frage bloß an die mehr einwandfreien Versuche 5 und 6 der Versuchsreihe II halten, aus denen hervorgeht, daß das Eindampfen des Leberbreies allein schon ein Entweichen N-haltiger Substanzen und einen dadurch bedingten Verlust an Trockensubstanz verursacht.

In dem nach erfolgter Autolyse eingedampften Leberbrei weist die Trockensubstanz der beiden Versuche (7 und 8) der Versuchsreihe II eine ziemlich einheitliche Abnahme auf, die

den durch einfaches Eindampfen (ohne vorangehende Autolyse) bedingten Verlust übertrifft.

Es geht hieraus die oben gestreifte, bereits bekannte Tatsache hervor, daß sich während der Autolyse flüchtige Substanzen bilden, die während des nachfolgenden Eindampfens verloren gehen. Der Umstand, daß der N-Verlust hierbei nicht größer ist als beim einfachen Eindampfen, dürfte vielleicht so gedeutet werden, daß die während der Autolyse entstehenden flüchtigen Verbindungen stickstofffrei sind.

Der vorangehend für die Versuche 9 und 10 der Versuchsreihe III vermutete Analysenfehler macht seine störende Wirkung auch in den Versuchen 11 und 12 geltend, denn die geringe Zunahme der Trockensubstanz im Versuch 11, sowie die im Vergleich mit Versuch 10 (ohne vorangehende Autolyse) geringere Abnahme der Trockensubstanz in Versuch 12 sind folgerichtiger dem erwähnten Analysenfehler als einer intramolekularen Wasseraufnahme zuzuschreiben. Es ergibt sich demnach, daß während der Autolyse eine weitere Menge flüchtiger, diesmal wahrscheinlich N-freier Verbindungen entsteht, die während des Eindampfens des autolysierten Organbreies ebenfalls verloren gehen.

Nun können wir darangehen, die Ergebnisse der Energiebestimmungen zu besprechen. Es liegt in der Art dieser Bestimmungen — sie wurden jedesmal bloß an dem eingetrockneten Brei vorgenommen —, daß ein Vergleich zwischen dem Energiegehalt des frischen und autolysierten Breies nicht möglich war, bloß ein solcher zwischen den ohne vorangehende Autolyse und nach erfolgter Autolyse erhaltenen Eindampfungsrückständen. Dadurch kam es, daß ein Energieverlust, der etwa von dem einfachen — von der Autolyse unabhängigen — Eindampfen herrührt, nicht ermittelt werden konnte.

Der Verlust, den der autolysierte Leberbrei während der Autolyse und der nachfolgenden Eindampfung erlitten hat, beträgt nach Abzug des auf das Eindampfen allein entfallenden Anteils, also für die Autolyse allein, im Durchschnitt aus allen vier Versuchen der Versuchsreihen II und III gegen 3,3 %.

Es ist dies ein ähnlicher Verlust, wie ihn, wenigstens in den besser gelungenen Versuchen 5 und 6 der Versuchsreihe II,

die Trockensubstanz und der N-Gehalt erlitten haben, nämlich 3,6 bzw. 3,1 %.

Die Schlüsse, die aus den oben beschriebenen drei Versuchsreihen gezogen werden können, lauten wie folgt:

1. Während der Autolyse findet unter den genannten Versuchsbedingungen eine geringe, jedoch sicher nachweisbare Verringerung des Energiegehalts des autolysierten Leberbreies statt.

2. Da eine ähnlich große Verringerung auch im Trockensubstanzgehalt nachzuweisen ist, durch die der Energieverlust hinreichend erklärt werden kann, darf mit großer Wahrscheinlichkeit gefolgert werden, daß die Wärmetönung des Autolysenvorganges gleich Null ist.

3. Eine mit der Autolyse einhergehende Hydrolyse war unter den genannten Versuchsbedingungen nicht nachzuweisen. —

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Prof. P. Hári ausgeführt.

Biochemische Bildung von Aminoäthylalkohol aus Serin.

Von

F. F. Nord.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.)

(*Eingegangen am 13. April 1919.*)

Den Aminoäthylalkohol, der zuerst durch die synthetischen Darstellungen von S. Gabriel[1]) und L. Knorr[2]) bekannt geworden und jüngst durch S. Fränkel und M. Cornelius[3]) einer genauen Untersuchung unterzogen ist, hat man später auch in der Natur aufgefunden, und zwar als Bestandteil bestimmter Phosphatide vom Charakter des Lecithins. G. Thudichum[4]) hat als erster darauf hingewiesen, daß bei der Hydrolyse des Gehirnphosphatides Kephalin das Oxyäthylamin auftritt. Seine große Verbreitung zeigte jedoch erst G. Trier[5]); er stellte die Substanz aus pflanzlichen und tierischen Phosphatiden dar, in denen sie ganz oder teilweise das schon seit langem als Bestandteil des Lecithins bekannte Cholin ersetzt. Durch die Befunde von W. Koch[6]) und H. Cousin[7]), S. Fränkel und E. Neubauer[8]) sowie S. Fränkel und L. Dimitz[9]) scheinen zwar die Angaben über das ausschließliche Auftreten des Aminoäthylalkohols als basisches

[1]) S. Gabriel, Ber. **21**, 566, 2664, 1888.

[2]) L. Knorr, Ber. **30**, 910, 1897.

[3]) S. Fränkel und M. Cornelius, Ber. **51**, 1654, 1918.

[4]) G. Thudichum, „Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere", Tübingen 1901.

[5]) G. Trier, Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 383, 1911; **76**, 497, 1911/12.

[6]) W. Koch, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 134, 1902.

[7]) H. Cousin, Journ. Pharm. et Chim. **23**, 225, 1906; **24**, 101, 1906; **25**, 177, 1907.

[8]) S. Fränkel und E. Neubauer, diese Zeitschr. **21**, 321, 1909.

[9]) S. Fränkel und L. Dimitz, diese Zeitschr. **21**, 343, 1909.

Spaltungsprodukt der Phosphatide eingeschränkt, doch haben andere Autoren wie A. Baumann[1]) und H. Thierfelder[2]) das natürliche Vorkommen des Oxyäthylamins, das auch neuerdings mit dem Trivialnamen Colamin bezeichnet wird, erwiesen.

Über die Bildungsweise des Cholins in der Natur haben E. Winterstein und G. Trier[3]) Hypothesen aufgestellt. Sie gingen von der Annahme aus, daß durch Kondensation von Formaldehyd zunächst Glykolaldehyd entstehe, der darauf durch Aminierung Aminoacetaldehyd liefere und von dem alsdann zwei Moleküle nach der Canizzarroschen Reaktion in Glykokoll und Aminoäthylalkohol übergehen können. Die Autoren zogen auch die Möglichkeit in Betracht, daß bereits der Glykolaldehyd die Canizzarrosche Reaktion erleide und dabei Äthylenglykol und Glykolsäure ergebe, während nachträgliche Aminierung ebenfalls zum Oxyäthylamin führt. Solange allerdings die Canizzarrosche Reaktion bei Körpern von der Empfindlichkeit des Glykolaldehyds oder des Aminoacetaldehyds nicht tatsächlich verwirklicht ist, wird man jedoch auch andere Bildungsweisen des Aminoäthylalkohols ins Auge fassen dürfen. Denn die Reagenzien, welche die Canizzarrosche Reaktion einleiten, in erster Linie die Alkalien, bringen ganz andere Veränderungen an den beiden in Betracht kommenden labilen Aldehyden hervor. Der Glykolaldehyd wird durch starkes Alkali zerstört, durch verdünntes in Tetrose[4]), Pentose[5]) und Hexose[6]) umgewandelt; der Aminoacetaldehyd wird durch konzentrierte Lauge unter Ammoniakentwicklung zersetzt, durch verdünnte zu einem Polymeren des Aminoacetaldehyds kondensiert[7]). Dagegen hat sich gezeigt, daß der Aminoacetaldehyd mit besonderer Leichtigkeit aus dem Glykokoll[8]) entstehen kann,

[1]) A. Baumann, diese Zeitschr. **54**, 30, 1913.
[2]) H. Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**, 296, 1915/16.
[3]) E. Winterstein und G. Trier, „Die Alkaloide", S. 311.
[4]) E. Fischer und Landsteiner, Ber. **25**, 2549, 1892.
[5]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **12**, 337, 1908.
[6]) Fenton und Jackson, Chem. News **80**, 177, 1899.
[7]) C. Neuberg und E. Kansky, diese Zeitschr. **20**, 455, 1909.
[8]) C. Neuberg, Ber. **41**, 956, 1908. — E. Fischer, Ber. **41**, 1019,

und die weitere Reduktion des Aminoacetaldehyds zum Aminoäthylalkohol ist ein Vorgang, dessen Verwirklichung nach den zahlreichen Erfahrungen in der Zuckergruppe durchaus im Bereiche der Möglichkeit liegt. Aber auch die direkte Herleitung des Oxyäthylamins aus einem Eiweißspaltungsprodukte, dem Serin, scheint denkbar. Das Serin kommt in der Natur nicht nur in Molekülverbänden der Proteine vor, sondern ist als ein Stoffwechselprodukt auch in freiem Zustande, z. B. im Schweiß[1]), beobachtet worden.

Das Oxyäthylamin ist nun das zum Serin gehörige Amin. Auf rein chemischem wie auf biologischem Wege sind schon mehrfach Eiweißspaltungsprodukte in die entsprechenden und daher als proteinogene Amine bezeichneten Basen übergeführt worden. Während dieser Vorgang bei den aromatischen und heterozyklischen Aminosäuren sowie bei den Diaminosäuren verhältnismäßig leicht vonstatten geht, scheint seine Verwirklichung bei den einfachen aliphatischen Aminosäuren mit größeren Schwierigkeiten verknüpft zu sein. Hier ist die Reaktion bisher nur bei einer einzigen Aminosäure geglückt, und zwar bei der α-Aminoisovaleriansäure; sie geht nach den Feststellungen von Neuberg und Karczag[2]) in Isobutylamin über. Bei allen übrigen aliphatischen α-Aminosäuren ist die biochemische Decarboxylierung bisher noch nicht ausgeführt, doch kann es angesichts des oft beobachteten Auftretens der entsprechenden einfachen Amine unter den Produkten der Fäulnis keinem Zweifel unterliegen, daß sie auch hier möglich sein muß.

Der Versuch mit Serin hatte unter Einhaltung bestimmter Bedingungen einen vollen Erfolg. Die Umwandlung der Aminosäuren bei der Fäulnis erfolgt im wesentlichen nach zwei Richtungen. Einmal entstehen durch Desaminierung Säuren, andererseits durch Decarboxylierung Amine. Den Abbau zu Säuren hat W. Brasch[3]) bei der gewöhnlichen Fäulnis des Serins festgestellt; er fand Ameisensäure und Propionsäure. Anders aber verläuft die Reaktion, wenn man unter anaeroben Bedingungen arbeitet; man gelangt dann zu dem entsprechenden basischen Spaltungsprodukt. Die Bedeutung des Luftabschlusses für die

[1]) G. Embden und Tachau, diese Zeitschr. 28, 230, 1910.
[2]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. 18, 435, 1909.
[3]) W. Brasch, diese Zeitschr. 22, 403, 1909.

Entstehung der Fäulnisbasen hat früher A. Ellinger[1]) erkannt und betont. Unter den Verhältnissen, die nachstehend im einzelnen angeführt sind, gelingt die Überführung des Serins in Oxyäthylamin. Die Isolierung geschah mittels der für diesen Zweck von L. Knorr (l. c.) empfohlenen Pikrolonsäure in der von H. Thierfelder und O. Schulze[2]) angegebenen Weise. Da jedoch das Pikrolonat des Oxyäthylamins und freie Pikrolonsäure zufällig eine prozentisch wenig abweichende Zusammensetzung[3]) aufweisen, so wurde die leicht ausführbare Umwandlung des Pikrolonats in die Chlorgold-Doppelverbindung vorgenommen.

Experimenteller Teil.

Zur Herstellung der Fäulnisflüssigkeit nach E. Salkowski wurden 5 g feingehacktes, schieres Rindfleisch mit 50 ccm lauwarmem Leitungswasser und 1 ccm einer halbgesättigten Sodalösung versetzt und 1 Tag im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. 10 ccm dieser Faulflüssigkeit wurden nunmehr zu einer Lösung von 10 g Serin in 1000 ccm Leitungswasser hinzugefügt, welches an Nährsalzen 0,1 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Ammonsulfat, 0,1 g Dikaliumphosphat sowie etwas Soda enthielt. und mit flüssigem Paraffinöl dick überschichtet.

Das Gemisch blieb sich 10 Tage im Brutschrank überlassen; es reagierte dann neutral. Behufs Gewinnung des basischen Reaktionsproduktes wurde die Paraffinschicht im Scheidetrichter abgetrennt, einmal mit wenig Wasser gewaschen und die abgelassene Flüssigkeit mit verdünnter Salzsäure schwach kongosauer gemacht, aufgekocht und nach dem Filtrieren bei 35° eingeengt.

Der halbfeste Rückstand wurde mit 10 g frisch gelöschtem Ätzkalk zu einem dicken, trockenen Brei verrührt. Da deutlich dabei Ammoniak frei wurde — die Desaminierung konnte nicht vollständig unterdrückt werden —, so wurde das Gemisch 24 Stunden über Schwefelsäure in einem nicht evakuierten Exsiccator aufbewahrt. Zwecks Isolierung der Base wurde dann das Kalkpulver quantitativ in eine Soxhlethülse gebracht

---

[1]) A. Ellinger, Ber. 31, 3183, 1898.

[2]) H. Thierfelder und O. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. 96, 296, 1915/16.

[3]) Oxäthylamin-Pikrolonat: C 44,28%, H 4,65%, N 21,54%.
Pikrolonsäure: C 45,45%, H 3,03%, N 21,21%.

und mit 280 ccm Äther ausgezogen, wobei die extrahierte Base durch die unter Beigabe von etwas Alkohol gelösten 2 g Pikrolonsäure sofort gebunden wurde. Die Extraktion war nach 30 Stunden beendet.

Der im Kolben allmählich entstandene Niederschlag, das Pikrolonat des Oxyäthylamins, wurde abgesaugt, zunächt mit alkoholhaltigem, dann mit reinem Äther gewaschen und in vacuo getrocknet. — Die Rohausbeute betrug 2,8 g Substanz, die nach zweimaligem Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol 2,4 g reines Salz vom Schmelzpunkt 210° lieferten.

0,1603 g Substanz gaben 0,2570 g CO_2, 0,0661 g H_2O.

$C_{10}H_8N_4O_5 . C_2H_7NO$. Berechnet: C 44,28%, H 4,65%;
gefunden: C 43,72%, H 4,57%.

Zwecks Überführung in die Chlorgoldverbindung wurden 1,63 g Pikrolonat (= 0,3 g Base) in möglichst wenig heißem Wasser gelöst und die noch leicht getrübe Lösung in der Hitze mit 2,2 ccm Salzsäure (D = 1,19) versetzt und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Nach Abfiltrieren der gut ausgefallenen Pikrolonsäure wurde die Lösung des Chlorhydrates einmal mit Essigester ausgeschüttelt und auf dem Wasserbade eingeengt.

Die Flüssigkeit gab in Gegenwart von Calciumcarbonat eine typische Violettfärbung mit Triketonhydrindenhydrat[1]). — Die eingeengte Flüssigkeit wurde mit überschüssiger Goldchloridlösung (2 g $AuCl_3$ in 25 ccm Wasser) versetzt, abermals eingeengt und die erstarrende Lösung über frisch geglühtem Calciumoxyd eingetrocknet. Das Rohsalz wurde mit absolutem Alkohol angefeuchtet, zweimal mit Alkoholäther (3 : 1 bzw. 1 : 6) gewaschen, abgesaugt, im Vakuumexsiccator getrocknet und schließlich aus wenig Wasser umkrystallisiert. Das Salz schmolz nach dem Trocknen bei 105° bei 185 bis 186°. Ausbeute 1,5 g.

$C_2H_7NO . HAuCl_4$. Berechnet: Au 49,10%; gefunden: Au 48,96%.

Durch die Überführung in die beiden von Knorr als charakteristische Derivate des Aminoäthylalkohols beschriebenen Salze ist die biochemische Entstehung des Oxyäthylamins aus Serin sichergestellt. Die Decarboxylierung mit Hilfe von Bakterien ist somit auch bei einer Oxyaminosäure bewerkstelligt.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **56**, 500, 1913.

Der Eisengehalt der Öle, Fette, Wachsarten, Harze, Gummiharze, Gummiarten; sowie einige Analysen über den Gehalt an Kieselsäure und Tonerde.

Von

M. Gonnermann.

(Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 21. April 1919.)

In den Berichten der Deutsch. Chem. Ges. **41**, 910 bis 915 21./3. veröffentlicht W. Glikin über den Eisengehalt der Fette, Lipoide und Wachsarten. Ein Referat über diese Arbeit befindet sich im Chem. Centralbl. **79**, 1908, I, 1564, dem ich die Angaben entnehme:

„In dem Fett des Knochenmarkes verschiedener Menschen und Tiere ist Eisen in nachweisbaren Mengen enthalten; die Art der Eisenverbindung unterscheidet sich wesentlich von den Nucleoalbuminen und Eisenalbuminaten, da sie in Alkohol, Chloroform, Äther löslich sind. In einer Tabelle sind die Resultate zusammengestellt, und daraus ergibt sich, daß das Knochenmark junger Tiere einen höheren Gehalt zeigt als das älterer, so z. B. beim neugeborenen Ferkel 1,15%, 6 Wochen alten 0,30%, bei 8 Wochen alten 0,15%, bei älteren Schweinen im Durchschnitt 0,03%. Beim Hund fällt in gleicher Weise der Eisengehalt des Knochenmarkes mit dem Wachstum der Tiere in folgender Abstufung ab: 4,35% (?), 0,44%, 0,32% und 0,05%. Hieraus ergibt sich, daß der Eisengehalt des Knochenmarks mit dem Wachstum der Tiere und Menschen rapid abnimmt und zwar in gleichem Verhältnis wie der Lecithingehalt und analog dem Eisengehalt der Leber, der bei neugeborenen Tieren etwa 10 mal größer ist als bei ausgewachsenen. Auch in pflanzlichen Fetten: Kakaobutter, in verschiedenen Ölen und Wachsarten findet sich Eisen. Durch Ausschütteln mit salzsaurem kalten Wasser läßt sich das Eisen nicht entfernen, so daß man zu der Annahme geführt wird, daß ein festgebundenes Fettmolekül vorliegt. Lecithin und Cholesterin, die ständigen Begleiter der Fette, enthalten Eisen.

Verfasser reinigte Lecithin Merck in methylalkoholischer Lösung mit Tierkohle, engte die Lösung ein und fällte durch Aceton, wobei eine fast farblose Masse erhalten wurde, die 0,173 %, 0,388 % und 0,181 % Eisen enthielt. Er nimmt als stöchiometrisches Verhältnis zwischen Lecithin und Eisen an, daß eine Kuppelung zwischen 1 Atom Eisen und 3 oder mehr Molekülen Lecithin stattfindet."

Bei meinen neuen Versuchen, die auf Anregung Koberts erfolgten, um die Eisenfrage der Fette nochmals zu bearbeiten, wurde auf die Aschenprozente des Eisens in dem verschiedenartigen Material besonders Rücksicht genommen, und zwar kam natürlich nur dasjenige in Betracht, was unter gegenwärtigen Verhältnissen zu erlangen war. Die anschließenden Drogen stammen aus der Sammlung des Institutes.

Die Vorproben mit gelbem und rotem Pferdemark wurden mit Äthylalkohol verrieben, öfter durch heißes Wasser erwärmt, die Nacht über stehen gelassen, dann filtriert und der Alkohol verdampft. Den Rückstand verrieb ich mit wenig Aceton; hierbei ballte sich in beiden Proben, im roten Mark mehr, eine dunkle Masse zusammen; der Aceton wurde klar abgegossen und verdampft, der Rückstand unter Zugabe von etwas Ammoniumsulfid versetzt; keine Schwarzfärbung, also frei von Eisen. Die ausgeschiedenen Massen wurden mit salzsaurem Wasser verrieben, gelinde erwärmt, die Säure klar abgegossen, mit Ammoniak neutralisiert, Schwefelammonium zugefügt: gleichfalls ohne Schwarzfärbung — also Eisen nicht in Lösung gegangen. Nunmehr wurden die Massen mit Salpetersäure erwärmt, oxydiert, mit Ammoniak die Flüssigkeit abgestumpft, Schwefelammonium zugefügt: ebenfalls keine Eisenreaktion.

In dieser minimalen Menge vom angewandten Material war also eine Abspaltung des Eisens nicht zu erreichen, so daß, wenn das Eisen an Lecithin gebunden, dasselbe sehr fest verankert ist.

Die Versuche wurden auf folgende Weise mit Pferdemark ausgeführt. Das rote Mark ließ sich im Mörser zu einer ganz glatten, salbenartigen Masse verreiben, während das gelbe Mark konstanter war und mit der Schere zu kleinen Stücken zerschnitten werden mußte. Um das anhängende Blut zu entfernen, weil bereits selbst eisenhaltig, wurde das zerkleinerte Mark mit destilliertem Wasser, das die Blutkörperchen

leicht löst, mehrmals ausgespült, die Nacht noch unter Wasser stehen gelassen, dann durch ein Sieb gegossen, nach Möglichkeit vom Wasser abgeschleudert und auf dem Dampfapparat nachgetrocknet. Beide Markproben wurden in Porzellantiegeln in kleinen Partien bei ganz kleiner Flamme auf Drahtnetz mit Asbestbelag zunächst erwärmt, bis sich ein deutliches Spratzen und Verbrennungsdämpfe entwickelten. Hierauf kamen die Tiegel auf offene kleine Flamme, bis sich die entwickelten Dämpfe entzünden ließen. Dieser letzte Verbrennungsakt vollzog sich ziemlich schnell und hinterließ zunächst eine leicht zerreibliche kohlige Asche.

I. Aus dem roten Mark, das 15,0 g betrug, wurden 0,162 g = 1,08 % dieser Asche erhalten; der geringen Menge wegen wurde sie sofort in demselben Tiegel, nachdem die am Rande befindliche Kohle vollständig durch Glühen verflüchtigt war, nochmals unter Zugabe von etwas Salpetersäure erhitzt, geglüht, nach dem Erkalten durch Salzsäure und wenig Salpetersäure in der Wärme behandelt, um das Eisen in Lösung zu erhalten; diese mit heißem Wasser verdünnt und einige Tropfen davon mit Blutlaugensalz geprüft: es entstand eine tiefblaue Färbung, die die Gegenwart von Eisen im roten Mark bewies. Es ist jedoch nicht zu vergessen, daß in dem roten Mark viel Blutfarbstoff enthalten und dieser selbst eisenhaltig ist, und zwar enthält die Blutasche 5,6 % Eisen, die von dem gefundenen Eisen der Markasche abgezogen werden muß, so daß für den Eisengehalt des im Mark enthaltenen Lecithins sich ein gewisses Mehr ergeben wird.

Die verdünnte salpetersaure Lösung wurde nun erwärmt mit Ammoniak gefällt, das ausgeschiedene Eisenhydroxyd auf gewogenem Filter ausgewaschen und bei 110° völlig ausgetrocknet. Es resultierten 0,035 g Fe_2O_3, die 0,0267 g Eisen entsprechen, und ergaben hiervon

0,178 % für Mark,
16,358 % für Asche

im roten Mark nach Abzug von 31 mg Prozent für den Gehalt an Eisen des Lecithins.

II. Das gelbe Mark wog 85,0 g, lieferte 0,486 g kohlefreie Asche = 0,572 %; diese wurde durch Säuren in der Wärme gelöst und das Eisen durch Ammoniak heiß ausgefällt.

Hierbei entstand jedoch ein sich schnell ausscheidender weißer Niederschlag, der nach der Prüfung sich als phosphorsäurehaltig ergab. Er wurde daher wieder in Salpetersäure gelöst und die Phosphorsäure durch Ammonmolybdat vollständig ausgefällt, im Filtrat wieder das Eisen durch Ammoniak gefällt. Bei der Berechnung ergaben sich

0,142% für Mark,
2,882% für Asche.

Wenn nun in den verschiedenen Fettarten sich festgebundenes Eisen findet, so wäre es doch wohl möglich, das Eisen chemisch künstlich einzuverleiben, und habe auch ich demgemäß Versuche angestellt. Das Resultat war ein günstiges; ich erhielt eine beim weiteren Verdünnen, z. B. mit dem farblosen Paraffinöl, völlig klare Lösung von einem Eisenoleat in Lecithin; verseifte ich dasselbe durch Ammoniak, verdünnte mit Wasser, erwärmte etwas und setzte Schwefelammonium hinzu, entstand eine tiefschwarze Mischung, Schwefeleisen enthaltend. Es ist also auch chemisch nachgewiesen, daß das Eisen in dem Lecithin als gelöstes Oleat enthalten war.

Das gelbe Mark enthielt durch das gründliche Auswaschen kein Blut mehr und sind die gefundenen Werte für Eisen einwandfrei.

III. Gesamtlipoide aus Pferdehirn (Dr. Witte). Es wurden 13,330 g verascht und nach Beseitigung der Phosphorsäure weiter verfahren, wie bei dem gelben Mark ausführlich angegeben ist. An Reinasche wurden 1,006 g erhalten, die für Lipoide 7,472% betrug. Eisen war nicht vorhanden; es erschien daher sehr wichtig, auch das Pferdegehirn auf Eisen zu untersuchen.

IV. Lecithin aus Pferdegehirn (Dr. Witte). Die Methode war dieselbe; es fand sich in 1,60% Asche

Eisen 0,121% für Lecithin,
7,706% für Asche.

Es wurden noch untersucht

V. Pferdehirn,

VI. Rogenlecithin (Dr. Witte), deren Resultate sich in der Tabelle befinden. Es folgten nunmehr die Untersuchungen von Wachs- und Fettarten, Ölen, denen sich die von Harzen,

Gummiharzen und Gummi anschließen, wie aus der Tabelle ersichtlich ist.

Lfd. Nr.	Untersuchungs-Material	Entstammt von	Trocken-substanz g	Asche in Trcksbst. %	Kieselsäure in % Trck.-Sbst.	Kieselsäure in % Asche	Tonerde % in Trck.-Sbst.	Tonerde % in Asche
1	Nebennieren 140,0 g	Menschlich	23,0	2,93	0,087	**2,972**	0,379	**13,819**
2	Desgl. 170,0 g	"	28,0	3,04	0,143	**4,700**	0,401	**13,361**
3	Leichenblut	"	16,0	5,0	0,063	**13,75**	0,350	**7,00**
4	Kriebelmücke Simulium reptans	Auswärts	5,0	8,32	0,603	**7,216**	0,640	**7,89**
5	Canthariden Lytta vericatoria	Apotheke	15,0	5,36	0,533	**9,953**	0,386	**7,21**
6	Pemphigus vulgaris	Hautklinik	13,0	29,631	6,054	**20,441**	1,310	**4,428**
7	Seegras Zostera marina	Ostsee	30,0	12,365	—	—	—	**0,916**
8	Stechapfelblätter Datura Stremmonium	Drogenhandlung	30,0	6,143	—	—	1,404	—
9	Bilsenkraut Hyoscyamus niger	"	30,0	10,05	0,007	**0,7**	1,160	—
10	Tollkirscheblätter Atropa Belladonna	"	30,0	5,70	—	—	0,640	—
11	Gerstesamen Hordeum vulgare	Institutssammlung	10,0	0,320	0,69	**28,40**	0,42	—
12	geschält	"	20,0	0,373	0,010	**1,67**	0,310	—
13	Blattspinat	Rubner	—	22,3	—	—	—	—
14	Spinat (überhaupt)	"	—	49,6	—	—	—	—
15	Grünkohl	"	—	9,4	—	—	—	—
16	Kohlrüben	"	—	3,8	—	—	—	—
17	Wirsing	"	—	7,8	—	—	—	—
18	Pfifferlinge Cantharellus cibarius	Käuflich	40,0	10,103	0,412	**4,93**	—	—
19	Steinpilz Boletus edulis	"	45,0	7,409	0,185	**2,514**	—	—
20	Maulbeerblätter Morus nigra	Stadtpark	140,0	13,478	4,07	**18,790**	3,00	**17,06**
21	„ Morus alba	"	20,0	15,4	3,400	**22,078**	3,945	**25,62**
22	Renntierflechte Cladonia rangiferina	Pharmakolg. Sammlung	6,0	—	—	—	9,17	—
23	Carragheen Fucus crispus	"	7,0	—	—	—	9,60	—
24	Isländisch Moos Cetraria islandica	"	8,0	—	—	—	3,07	—

Nachweis des Eisens.

I. Fette.

Lfd. Nr.	Untersuchungs-Material	Entstammt von	Trocken-substanz g	Asche % in der Trcksbst.	Eisen % in Trock.-Subst.	Eisen % in Asche
1	Knochenmark, rot	Pferd, Oberschenkelkn.	15,0 (frisch)	1,08	0,178	**16,358**
2	Desgl., gelb	"	85,0 (frisch)	0,572	0,140	**2,882**
3	Gehirn	Pferd	30,0 (frisch)	1,315	0,360	**8,355**
4	Lipoide (Witte)	Pferdegehirn	13,331	7,472	frei	
5	Lecithin (Witte)	"	12,250	1,600	0,121	**7,700**
6	Desgl.	Rogen	13,560	4,846	0,256	**4,051**
7	Desgl., älteres Präparat	"	12,830	4,131	0,113	**4,131**
8	Wachs, gelbes Apis mellifica	Instituts-Sammlung	25,0	0,048	0,120	**0,292**
9	Japan-Wachs Rhus succedanea	"	25,0	0,096	0,0086	**0,010**
10	Carnauba-Wachs Capernicia cerifera	"	25,0	0,153	0,0748	**3,252**
11	Kakaoöl Theobroma Cacao	"	25,0	0,096	In Reaktion vorh., nicht wägbar	
12	Walrat Cetaceum	"	25,0	0,032	"	
13	Kokosöl Cocos nucifera	"	25,0	0,028	"	
14	Pferdefett Equus caballus	Fleischerei	45,0	0,111	0,020	**0,180**
15	Palmöl Elaeis gujanensis	Henkel, Düsseldorf	30,0	0,034	Nur durch Reaktion nachweisbar	
16	Palmkernöl Elaeis gujanensis	"	30,0	0,040	"	
17	Mowrahöl	"	30,0	0,100	"	
18	Wollfett, rohes Adeps lanae	"	30,0	1,470	0,0472	**3,187**
19	Desgl., reines	"	30,0	0,014	Nur durch Reaktion nachweisbar	
20	Wollfett für veterinären Gebrauch	"	30,0	0,802	0,0233	**2,834**
21	Wollfett neutrales	Henkel	30,0	0,109	Vorhanden, nicht wägbar	
22	Menschenfett Homo sapiens	Path. Institut (frisch)	70,0	0,128	0,0187	**0,120**
23	Oeseppus (Dr. Ihle) Wollfettpräparat	"	30,0	0,106	0,030	**0,300**

Ehe ich die Tabelle über den Eisengehalt der oben angeführten Wachsarten usw. folgen lasse, sollen noch einige Untersuchungen Platz finden, die während des Druckes meiner Veröffentlichung über „Die quantitative Ausscheidung der Kieselsäure im menschlichen Harn“[1]) ausgeführt worden sind, die zum Teil den Gehalt an Kieselsäure, zum Teil an Tonerde betreffen.

Die Harze sind weiche oder feste Ausscheidungsprodukte der Pflanzen, die als solche zum Teil bereits in denselben entstehen, zumeist jedoch erst beim Austreten an der Luft aus den Balsamen sich abscheiden. Diese Balsame sind Lösungen der Harze in ätherischen Ölen, und beim Verdunsten derselben bleiben die Harze zurück.

Bereits sind die Harze zum Teil aus Verbindungen des im Steinkohlenteer befindlichen Kumaron und Inden künstlich dargestellt worden, indem diese Stoffe eine große Neigung haben, sich zu Kumaron- und Indenharz zu polymerisieren; sie finden viel Anwendung in der Lackindustrie[2]). Nach englischem Patent werden organische Oxysäuren, z. B. Weinsäure, mit Formaldehydlösungen unter Zusatz von Phenol in mit Blei ausgefütterten Gefäßen erwärmt und dann gekocht. Es erscheinen auf der Oberfläche harzartige Massen, die durch heißes Wasser gewaschen werden.

Dr. Goldschmidt stellt blauen Siegellack von einem Harz her, das aus Formaldehyd, Methyldiphenylamin und Salzsäure erhalten wird. Kopalersatz erhält man, wenn Monoäthylanilin, überschüssiges Formaldehyd und Salzsäure in der Kälte aufeinander wirken und längere Zeit stehen läßt; es wird dann das gebildete Harz durch Natronlauge gefällt. —

Fossile Harze sind Bernstein, Asphalt und Ozokerit.

Bei der Untersuchung auf Eisen wird die kohlefreie Asche mit Salzsäure unter Zugabe von Salpetersäure ausgekocht, das Filtrat durch Ammoniak gefällt, das ausgewaschene Eisenhydroxyd bei 110° getrocknet und aus dem Gewicht nach der Gleichung 160 : 120 = ? : x das x als Eisen berechnet. Ebenso verlaufen die Untersuchungen der Gummiharze und Gummiarten.

---

[1]) Diese Zeitschr. **1919**.

[2]) Vgl. Chem.-Zeitg. **23/24**, 93, 1918; **28**, 109.

II. Harze.

Lfd. Nr.	Untersuchungs-Material	Entstammt von	Trockensubstanz g	Asche % in der Trcksbst.	Eisen % in Trock.-Subst.	Eisen % in Asche
1	Benzoë, Sumatra Resina Benzoë	Instituts-Sammlung	30,0	1,20	0,132	**1,143**
2	Benzoë, Siam	"	30,0	0,70	0,057	**0,820**
3	Benzoë Colophon Colophonium Benzoës	"	35,0	3,904	0,857	**2,921**
4	Dammar Resina Dammara	"	30,0	0,070	Vorh., nur durch Reakt. nachweisb.	
5	Drachenblut Sanguis Draconis canariensis	"	30,0	1,455	0,193	**1,315**
6	Elemi Resina Elemi	"	35,0	3,143	Vorh., nur durch Reakt. nachweisb.	
7	Kopal, ostind., Resina Copal	"	35,0	0,018	0,0086	**0,172**
8	Fichtenharz Resina Pini	"	35,0	0,040	Vorhanden, doch nicht wägbar	
9	Guajacharz Resina Guajavi	"	35,0	0,291	0,071	**0,230**
10	Mastix Resina Mastiche	"	35,0	0,194	0,023	**0,118**
11	Sandarac, marokkan. Resina Sandaraca	"	35,0	0,109	0,044	**0,408**
12	Bernstein Resina Succini	"	35,0	0,057	0,090	**0,450**

III. Gummiharze.

Die Gummiharze sind bekanntlich innigste Gemische von Harz und Gummi, die beim Verreiben mit Wasser eine Harzemulsion geben ähnlich den Öl- und Samenemulsionen. Hierbei wird der Gummi entweder gänzlich gelöst — Arabin — wie das arabische Gummi, oder, wie bei dem Traganth, nur in eine schleimige Substanz — Bassorin — übergeführt, wodurch das feinverteilte Harz in der Mischung schwebend erhalten bleibt. Die Gummiharze — oder Schleimharze — sind Bestandteile der Milchsäfte, die, aus den verwundeten Pflanzen fließend, erhärten — sie werden zu Balsamen; zum Teil enthalten sie ätherische wie auch fette Öle.

III. Gummiharze.

Lfd. Nr.	Untersuchungs-Material	Entstammt von	Trocken-substanz g	Asche °/₀ in der Trcksbst.	Eisen °/₀ in Trock.-Subst.	Eisen °/₀ in Asche
1	Ammoniak Gi. res. Ammoniacum in massis	Instituts-Sammlung	35,0	4,349	0,591	**13,600**
2	Asa foedita Gi. res. Asae foeditae in massis	„	35,0	7,057	0,554	**7,854**
3	Euphorbium Gi. res. Euphorb. Marokko	„	30,0	13,10	**1,650**	**1,480**
4	Galbanum Gi. res. Galbanum	„	35,0	6,310	1,860	**29,07**
5	Gutti Gi. res. Gutti Siam	„	35,0	1,114	Vorhanden, doch nicht wägbar	
6	Myrrhe Gi. res. Myrrha Arabien	„	35,0	0,400	Vorhanden, doch nicht wägbar	
7	Weihrauch Gi. res. Olibanum Ostafrika	„	35,0	1,366	0,023	**0,118**
8	Scammonium Gi. res. Scammonium Aleppo	„	35,0	15,25	2,00	**13,133**

IV. Gummiarten.

Die Gummiarten finden sich in den Säften der betreffenden Pflanzen gelöst, sind in Gruppen dünnwandiger Zellen eingeschlossen, die sich häufig zu Gummikanälen erweitern. Während der heißesten Jahreszeit der Tropen quillt durch Bersten der Rinde der Inhalt hervor, verliert an der Luft seinen Wassergehalt und erhärtet zu festen Massen. Auch sammeln die Eingeborenen durch gemachte lange Einschnitte zu bestimmten Zeiten an Ästen und Zweigen, besonders der Akazien, den reichlich austretenden Gummi.

Vertreter sind nur

Gummi arabicum = Gi. Mimosae.
Gummi Senegal.
Gummi Traganth.

Die beiden ersten enthalten das im Wasser lösliche Arabin, im Traganth befindet sich das im Wasser nur quellende Bassorin zu einem gallertartigen, halbdurchsichtigen Schleim.

IV. Gummiarten.

Lfd. Nr.	Untersuchungs-Material	Entstammt von	Trockensubstanz g	Asche % in der Trcksbst.	Eisen % in Trock.-Subst.	Eisen % in Asche
1	Gummi arabibicum Gemisch Arabien	Instituts-Sammlung	35,0	2,131	Vorhanden, jedoch nicht wägbar	
2	Senegal Gummi	"	35,0	6,315	Frei von Eisen, selbst nach längerem Stehen bewirkte Blutlaugensalz keine Bläuung	
3	Traganth Smyrna	"	35,0	1,630	0,026	**1,632**

Aus den vielen Untersuchungen der verschiedenartigsten Materialien ergibt sich, daß mit Ausnahme von 2 — die Lipoide aus Pferdegehirn, sowie der Senegal-Gummi —, die sich als frei von Eisen erwiesen, der Gehalt dieses Elementes in der Asche, den ich als wertvolles Resultat betrachte, von nicht wägbaren Mengen bis 29,7 % aufstieg. Es gehört also das Eisen in den Ausscheidungen der Pflanzenzellsäfte zu den konstanten Bestandteilen, wie in den Säften und Organen des menschlichen und tierischen Körpers.

Über quantitative Versuche mit dem Succinicoxydon von Battelli und Stern[1]).

Von

Hans Einbeck.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin nnd dem physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 21. April 1919.)

Die im Anschlusse an die Auffindung von Fumarsäure im Extrakte von frischem Fleische[2]) durchgeführte qualitative Aufarbeitung eines Oxydationsversuches von Bernsteinsäure mittels Muskelbreis nach Battelli und Stern hatte ein Gemisch von Fumarsäure und Bernsteinsäure geliefert. Dieser Befund, der allerdings mit den nach den Angaben von Battelli und Stern verbrauchten Sauerstoffmengen[3]) im Widerspruche stand, hatte mich zu der Annahme veranlaßt, daß die Fumarsäure das einzige Reaktionsprodukt der Einwirkung des Succinicoxydons auf Bernsteinsäure sei. Ich hatte seinerzeit quantitative Versuche mit dem Succinicoxydon in Aussicht genommen, um den Übergang von Bernsteinsäure zu Fumarsäure zu studieren. Die liebenswürdige Bereitwilligkeit, mit der Herr Professor Dr. F. Battelli und Fräulein Prof. Dr. L. Stern mir die Erfahrungen und die Apparatur des Genfer physiologischen Instituts zur Verfügung stellten, wofür ich ihnen auch hier meinen verbindlichsten Dank aussprechen möchte, versetzte mich in die angenehme Lage, diese Versuche im Frühjahr 1914 in Genf durchführen zu können. Es zeigte sich hierbei, um das gleich

[1]) Diese Zeitschr. **52**, 226, 1913.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**, 301, 1914.
[3]) Diese Zeitschr. **30**, 176, 1910.

vorwegzunehmen, daß der vorstehend erwähnte Befund von Bernsteinsäure neben Fumarsäure zweifellos durch die ungenügende Durchführung des damaligen Oxydationsprozesses[1]) verursacht war und infolgedessen zur Beurteilung des Reaktionsverlaufes nicht mehr herangezogen werden kann.

Um die chemischen Vorgänge bei der Einwirkung von ausgewaschenem Muskelbrei auf Bernsteinsäure bei Gegenwart von Sauerstoff aufzuklären, erschien es mir hauptsächlich erforderlich, festzustellen, wie sich das Verhältnis zwischen der angewendeten Bernsteinsäuremenge und dem verbrauchten Sauerstoff gestaltet, wenn bei den Versuchen, die bis zur Erschöpfung durchgeführt werden müssen, bei gleichbleibender Muskelbreimenge der Gehalt an zugefügter Bernsteinsäure variiert wird. Es wurden deshalb 4 Versuche gleichzeitig mit steigenden Bernsteinsäuremengen (0,0, 1,1, 2,2, 3,3 g) als Natriumsalz angesetzt und der absorbierte Sauerstoff gemessen. Beschaffenheit und Menge des Muskelbreis sowie Konzentrationsverhältnisse waren hierbei die bisher in Genf üblichen[2]).

Die ersten 4 Versuche lieferten eindeutige Resultate. Ich hielt es jedoch für wünschenswert, durch eine zweite Versuchsreihe die ersten Befunde zu kontrollieren. Ich benutzte die Gelegenheit, um die Versuchsbedingungen sowohl hinsichtlich der Beschaffenheit und Menge des angewendeten Muskelbreis, als auch der Konzentrationsverhältnisse abzuändern.

Nachstehende Tabelle zeigt die in beiden Versuchsreihen verbrauchten Sauerstoffmengen:

Angewendete Bernsteinsäure in g .		0,0	1,1	2,2	3,3
Absorbierter Sauerstoff in ccm (bei 40^0 und 730 mm) . . .	I	0	140	264	395
	II	0	139	260	389

Es zeigt sich also, daß der Sauerstoffverbrauch in beiden Reihen proportional der zugesetzten Bernsteinsäuremenge ansteigt.

Reduziert man die gefundenen Sauerstoffzahlen auf 0^0 und 760 mm, so erhält man im Durchschnitt aus beiden Reihen die Werte

107 ccm 201 ccm 300 ccm

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**, 304, 1914.

[2]) Diese Zeitschr. **30**, 177, 1910.

Berechnet man andererseits die Mengen Sauerstoff, die, auf 1 Mol $C_4H_6O_4$ 1 Atom 0 gerechnet, 1,1, 2,2 und 3,3 g Bernsteinsäure entsprechen, so erhält man die Zahlen

104 ccm 208 ccm 313 ccm

Aus dem Vergleich der wirklich verbrauchten und der berechneten Sauerstoffmengen ergibt sich, daß in allen Fällen innerhalb gewisser Fehlergrenzen auf 1 Mol Bernsteinsäure 1 Atom Sauerstoff aufgenommen worden ist. Dieser Befund entspricht den Angaben von Battelli und Stern[1]).

Wie bereits oben erwähnt, unterschieden sich die Reihen I und II hinsichtlich der Qualität und Quantität des angewandten Muskelbreis und ebenso hinsichtlich der Konzentrationsverhältnisse.

In Reihe I kamen je 90 g, in Reihe II je 50 g Muskelbrei zur Verwendung. Muskelbrei I wurde 5 Stunden nach der Schlachtung und nach 5maligem Auswaschen mit Wasser verbraucht, Muskelbrei II dagegen wurde gleich nach der Schlachtung 10mal mit Wasser gewaschen, 24 Stunden bei 0^0 aufbewahrt und dann zum Versuch verwendet. Außerdem waren die Flüssigkeitsmengen, in denen gearbeitet wurde, in der Reihe I größer als in Reihe II, mithin die Konzentration des bernsteinsauren Natriums in I kleiner als in II.

Durch diese Verschiedenheiten in den Versuchsbedingungen wurden, wie nachstehende Tabelle zeigt, erheblich nur die zur Vollendung der Oxydation benötigten Zeiten beeinflußt.

Versuch		2	3	4
Reihe I	Minuten	60	90	120
Reihe II	„	60	120	180

Diese Differenzen erscheinen mir aber für die Aufklärung der rein chemischen Verhältnisse unwesentlich.

Zur Aufarbeitung des Oxydationsgemisches wurde dasselbe nach vorsichtiger Ansäuerung mit Essigsäure 15 Minuten in das siedende Wasserbad eingesetzt, wodurch ausreichende Koagulation erzielt werden konnte. Nach kurzer Abkühlung wurde durch Watte filtriert, mit siedendem Wasser nachgewaschen und das Filtrat nebst Waschwässern auf dem Wasserbade eingedampft. Der ziemlich erhebliche Rückstand

[1]) Diese Zeitschr. 30, 178, 1910.

wurde mit Wasser ausgekocht. Nach dem Filtrieren durch ein dichtes Filter wurde wiederum eingedampft und so ein teigartiger Rückstand erhalten, der allerdings immer noch einen erheblichen wasserunlöslichen Anteil enthielt.

Zur Aufarbeitung im Extraktionsapparate wurde entweder der gesamte Rückstand in 10⁰/₀iger Schwefelsäure suspendiert oder aber das wäßrige Filtrat desselben mit so viel Schwefelsäure versetzt, daß eine 10⁰/₀ige Lösung entstand. Ein wesentlicher Unterschied in der Ausbeute konnte bei den verschiedenen Methoden nicht beobachtet werden. Bei der Extraktion mit alkoholfreiem Äther zeigte es sich, daß ein Teil der freigewordenen Säuren schon innerhalb der ersten Stunden in den Äther überging (Extraktion I), ein anderer Teil dagegen wurde deutlich schwerer vom Äther aufgenommen, so daß die Extraktion bis zu 24 Stunden ausgedehnt wurde (Extraktion II). Die Ätherextrakte wurden nach Zugabe von etwas Wasser vorsichtig abgedampft und nach Entfernung von etwas ausgeschiedenem Fett zur Trockne gebracht. Nach längerem Stehen im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure, wobei die Rückstände teilweise krystallinisch erstarrten, wurde gewogen. Die so erhaltenen Rohsäuren löste ich in ca. 20 Teilen Wasser und versetzte mit einem Überschuß von festem Silbernitrat. Aus der sauren Lösung fiel sofort bei allen aus ersten Extraktionen stammenden Rückständen fumarsaures Silber[1]) aus, das nach 24 Stunden abfiltriert, säurefrei gewaschen und, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, aufgearbeitet wurde. Die aus den zweiten Extraktionen stammenden Rückstände enthielten nur spurenweise Fumarsäure.

Die gefundenen Fumarsäuremengen (s. Tabelle) schwanken, auf die angewendeten Bernsteinsäuremengen berechnet, zwischen 22,5 und 30,0⁰/₀. Die Identifizierung der gewonnenen Fumarsäure erfolgte durch den sehr charakteristischen Schmelzpunkt, Fumarsäure 280 bis 285⁰, (Bernsteinsäure 185⁰), Mischschmelzpunkt und Analysen.

Die Filtrate des fumarsauren Silbers lieferten beim Neutralisieren mit Ammoniak erhebliche Niederschläge. Dieselben wurden abfiltriert, säurefrei gewaschen und mit Schwefelwasser-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**, 305, 1914.

stoff zersetzt. Nach dem Eindampfen hinterblieb ein gelber sirupöser Rückstand, der im Vakuumexsiccator allmählich erstarrte. Infolge der verhältnismäßig geringen zur Verfügung stehenden Mengen und der beobachteten leichten Zerfließlichkeit der Rohsäuren gelang es nicht, die vorliegende Säure krystallinisch zu gewinnen. Die Rückstände wurden deshalb in Wasser aufgenommen, mit Chlorcalciumlösung versetzt und die Lösung mit Ammoniak neutralisiert. Eine direkte Fällung erfolgte nicht, auch beim Kochen entstanden nur geringfügige Niederschläge. Auf Zusatz von $1^1/_2$ Teilen Alkohols zur siedenden Lösung dagegen fielen sofort dichte Niederschläge, die nach 24stündigem Stehen im Eisschrank abgesaugt wurden. Die so erhaltenen Calciumsalze zeigten sich schwer löslich in kaltem wie siedendem Wasser. Die zahlreichen Analysenzahlen der nicht umkrystallisierten Calciumsalze stimmen gut überein und zeigen, daß ein Calciumsalz der Äpfelsäure mit 1 Mol Krystallwasser vorliegt.

Zur Orientierung über die Mengen der isolierten Äpfelsäure habe ich in der Haupttabelle unter Äpfelsäure zunächst die Mengen der Rohsäuren und bei Versuch 2 Nr. 4 die aus den gewonnenen Calciumsalzen berechnete Äpfelsäuremenge = 54,2%₀ aufgeführt.

Die von mir früher ausgesprochene Ansicht, daß die Fumarsäure das Hauptreaktionsprodukt der Einwirkung von Succinicoxydon auf Bernsteinsäure sei[1]), schien damit widerlegt zu sein, zumal nach der Angabe von Battelli und Stern die Fumarsäure durch das Succinicoxydon nicht oxydiert werden soll[2]). Ich hielt es aber doch für wesentlich, diese Angabe, die sich nur auf die Beobachtung stützt, daß ein Gemisch von ausgewaschenem Muskelbrei und fumarsaurem Natrium in wäßriger Lösung aus einer Sauerstoffatmosphäre keinen Sauerstoff absorbiert, daraufhin zu prüfen, ob die Fumarsäure aus dem Reaktionsgemisch unverändert zurückgewonnen werden kann.

Zu diesem Zwecke wurden 2,5 g fumarsaures Natrium = 1,5 g Fumarsäure, gelöst in 300 ccm Wasser mit 75 g gut ausgewaschenem Muskelbrei unter Durchleitung von Sauerstoff und Turbinieren 2 Stunden auf 40° erwärmt (Versuch 4). Die

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**, 308, 1914.
[2]) Diese Zeitschr. **31**, 489, 503/4, 1911.

Aufarbeitung des Versuches lieferte nur 25,6 % Fumarsäure unverändert zurück. Aus dem Filtrat des fumarsauren Silbers wurde ebenso wie bei den Bernsteinsäureversuchen ein Calciummalat + 1 Mol Krystallwasser erhalten.

Auf diesen Befund hin war Fräulein Prof. Stern in Genf so liebenswürdig, dort einen Versuch mit Fumarsäure genau entsprechend den von mir mit Bernsteinsäure angestellten durchzuführen. Nach ihrem Bericht (vom 3. Juli 1914) wurden 2 mal 60 g Muskelbrei + 3 g fumarsaurem Natrium in wäßriger Lösung in einer Sauerstoffatmosphäre 2 Stunden bei 40° geschüttelt. Sauerstoffabsorption konnte nicht wahrgenommen werden (Versuch 5). Die Aufarbeitung lieferte 37 % Fumarsäure unverändert zurück, die Filtrate vom fumarsauren Silber ergeben gleichfalls Calciummalat + 1 Mol Krystallwasser. Die Ausbeute an Äpfelsäure, berechnet aus dem erhaltenen Calciumsalz, betrug 45,9 %.

Aus den Ergebnissen der Versuche 4 und 5 ersieht man, daß unter der Einwirkung des Muskelbreis eine Wasseranlagerung an die Doppelbindung der Fumarsäure stattfindet. Diese Reaktion, die zur Bildung von optisch-inaktiver Äpfelsäure führt, ist bereits lange bekannt. Wie Skraup[1]) gezeigt hat, genügt das Erhitzen mit Wasser auf 180°, um Fumarsäure teilweise in racemische Äpfelsäure überzuführen. Es ist also anzunehmen, daß der ausgewaschene Muskelbrei neben dem Succinicoxydon eine Substanz enthält, die die Wasseranlagerung an die Kohlenstoffdoppelbindung der Fumarsäure typisch-katalytisch beschleunigt.

Was die Oxydationswirkung des Muskelbreis der Bernsteinsäure gegenüber betrifft, so scheint diese Reaktion einstweilen einzigartig dazustehen. Zunächst glaubte ich allerdings, eine gewisse Übereinstimmung zwischen der Einwirkung des Succinicoxydons auf Bernsteinsäure, die zu Fumarsäure und Äpfelsäure führt, und den Oxydationsvorgängen im Organismus, die Buttersäure in β-Oxybuttersäure[2]) und Phenylpropionsäure in ein Gemisch von β-Oxyphenylpropionsäure und Phenylacrylsäure[3]) überführen, annehmen zu dürfen. Es schien mir durchaus

---

[1]) Monatsh. f. Chem. 12, 113, 1891.

[2]) L. Blum, Münch. med. Wochenschr. 57, 683, 1909.

[3]) H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. 4, 419; 6, 203, 1909.

nicht unwahrscheinlich zu sein, daß Muskelbrei bei Gegenwart von Sauerstoff auch die Oxydation von Buttersäure und Phenylpropionsäure herbeiführen könnte. Fräulein Professor L. Stern war so liebenswürdig, derartige Versuche anzustellen, wofür ich auch hier verbindlichst danken möchte. Die Resultate waren aber nach Privatmitteilungen von Fräulein Professor Stern sämtlich negativ. Die Gegenwart von Muskelbrei brachte nur Bernsteinsäure mit Sauerstoff in Reaktion. Der Beweis dafür, daß das Ausbleiben einer Oxydationserscheinung nicht durch eine schädigende Wirkung von Buttersäure und Phenylpropionsäure auf das Succinicoxydon bedingt ist, wurde dadurch erbracht, daß Bernsteinsäure bei Gegenwart beider Säuren lebhaft Sauerstoff absorbiert. Dieser Befund zeigt, daß die Wirkungsweise des Muskelbreis nicht durch eine einfache Aktivierung des Sauerstoffs erklärt werden kann.

Ich möchte allerdings nicht unterlassen, hier auf die Beobachtungen verschiedener Forscher hinzuweisen, die zeigen, daß die Wasserstoffe der beiden Methylengruppen der Bernsteinsäure durch eine gewisse Beweglichkeit ausgezeichnet sind. Neben der Bildung des Succinilobernsteinsäureesters[1]) und der verschiedenen Kondensationsprodukte des Bernsteinsäureesters mit Ketonen[2]) möchte ich besonders die Darstellung der Dibenzalbernsteinsäure durch die Kondensation von Benzaldehyd mit Bernsteinstäurediäthylester bei Gegenwart von Natriumäthylat[3]) hervorheben.

Merkwürdigerweise zeigt im Gegensatze zu diesen Beobachtungen die Bernsteinsäure im allgemeinen eine ungewöhnliche Widerstandsfähigkeit gegen direkte Oxydationsmittel. So kann nach den verschiedensten Angaben Bernsteinsäure aus konzentrierter Salpetersäure umkrystallisiert werden[4]). Kaliumpermanganat greift sie in saurer Lösung nicht an[5]). Auch gegen Wasserstoffsuperoxyd in neutraler Lösung ist Bernsteinsäure beständig im Gegensatz zu Äpfelsäure, die in Oxalessig-

---

[1]) Herrmann, Lieb. Ann. **211**, 306, 1882.
[2]) H. Stobbe, Lieb. Ann. **308**, 67, 1899; **321**, 83, 1902.
[3]) H. Stobbe und Ph. Naoúm, Ber. **37**, 2240, 1904.
[4]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **67**, 71, 1914.
[5]) J. Seemann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 229, 1905.

säure übergeführt wird[1]), und Buttersäure[2]) und Phenylpropionsäure[3]), die beide leicht als Ammoniumsalze oxydativ abgebaut werden. Als besonders charakteristisch möchte ich hier anführen, daß Dakin nach der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf glutaminsaures Ammoniak 47% Bernsteinsäure aus dem Reaktionsgemisch isolieren konnte[4]). Allerdings hat Neuberg kürzlich gezeigt, daß beim Kochen der freien Bernsteinsäure mit 2%iger Wasserstoffsuperoxydlösung bei Gegenwart von Ferrosulfat eine andere Reaktion eintritt[5]). Es entsteht dabei unter Spaltung des Moleküls Acetaldehyd.

Vergleicht man mit diesen Beweisen für die außerordentliche Beständigkeit der Bernsteinsäure gegen Oxydationsmittel die Leichtigkeit, mit der ausgewaschener Muskelbrei die Einwirkung von Sauerstoff auf Bernsteinsäure herbeiführt, so wird man im Gegensatz zu der Ansicht von E. Herzfeld und R. Klinger[6]), die im Absatz 3 der Zusammenfassung ihrer

Versuch	Nummer	Fleischbrei	Zugefügte Bernsteinsäure	Verbrauchter Sauerstoff	Gebrauchte Zeit	Rohsäuren		Fumarsäure		Äpfelsäure		
						I. Extraktion	II. Extraktion		Prozente der angewendeten Bernsteinsäure	Rohsäure	aus gewonnenem Ca-Salz berechnet	Prozente der Ausgangssäure
		g	g	ccm	Min.	g	g	g		g	g	
1	1	90	0	0	60	—	—	—	—	—	—	—
1	2	90	1,1	140	60	7)						
1	3	90	2,2	264	90	2,379	0,417	0,652	30,0	1,800	—	—
1	4	90	3,3	395	120	2,873	7)	0,805	24,8	2,031	—	—
2	1	50	0	0	60	0,004	—	—	—	—	—	—
2	2	50	1,1	139	60	0,761	0,418	0,264	24,4	—	—	—
2	3	50	2,2	260	120	2,420	0,373	0,487	22,5	2,156	—	—
2	4	50	3,3	389	180	3,406	0,836	0,830	25,6	—	2,025	54,2
4	—	75	1,5 Fumarsäure	—	120	0,870	0,670	0,384	25,6	—	—	—
5	—	120	3,9 Fumarsäure	—	120	3,510	nicht gewogen	1,052	27,0	—	2,066	45,9

1) H. J. H. Fenton und H. O. Jones, Proc. Chem. Soc. **15**, 224. 1901.
2) H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. **4**, 776, 1908.
3) H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. **4**, 419, 1908.
4) H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. **5**, 409, 1909.
5) C. Neuberg, diese Zeitschr. **67**, 71, 1914.
6) Diese Zeitschr. **93**, 352, 1919.
7) Verloren gegangen.

Arbeit: „Zur Biochemie der Oxydationen“ schreiben: „Die in den lebenden Organismen ablaufenden Oxydationen werden auf die Gegenwart aktiven O_2 und leicht oxydabler, niederer Stoffwechselprodukte zurückgeführt; die Annahme besonderer Oxydationsfermente ist entbehrlich“, zu der Überzeugung gebracht, daß in diesem Falle zunächst das Vorhandensein eines streng spezifischen Oxydationsfermentes bewiesen zu sein scheint.

Analysen[1]).

Fumarsäure.

I. Substanz aus Versuch 1 Nr. 3.

4,163 mg Substanz gaben 6,44 mg CO_2 und 1,25 mg H_2O,
3,930 „ „ „ 6,05 „ CO_2 „ 1,28 „ H_2O.

II. Substanz aus Versuch 2 Nr. 2, 3 und 4 vereinigt.

0,1805 g Substanz gaben 0,2736 g CO_2 und 0,0567 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_4O_4 = 116$. C = 41,37 %,
H = 3,49 %.

Gefunden: C I = 42,19 %, 41,99 %. II = 41,34 %,
H I = 3,35 %, 3,64 %. II = 3,51 %.

Äpfelsaures Calcium.

A. Substanz aus Versuch 2 Nr. 2.

4,570 mg Substanz gaben 4,32 mg CO_2 und 1,46 mg H_2O,
0,2345 g „ „ 0,071 g CaO.

B. Substanz aus Versuch 2 Nr. 3.

0,1895 g Substanz gaben 0,1763 g CO_2 und 0,0522 g H_2O.

C. Substanz aus Versuch 2 Nr. 4.

5,838 mg Substanz gaben 5,48 mg CO_2 und 1,77 mg H_2O.

D. Substanz aus Versuch 4.

5,580 mg Substanz gaben 5,155 mg CO_2 und 1,77 mg H_2O,
0,1870 g „ „ 0,056 g CaO.

E. Substanz aus Versuch 5 Extraktion I.

4,970 mg Substanz gaben 4,67 mg CO_2 und 1,53 mg H_2O,
0,2415 g „ „ 0,0727 g CaO.

F. Substanz aus Versuch 5 Extraktion II.

0,2486 g Substanz gaben 0,0738 g CaO.

---

[1]) Die Mikroanalysen verdanke ich wieder Herrn Dr. Hans Lieb, Graz.

Berechnet für $C_4H_4O_5Ca + H_2O = 190$. C = 25,23 %,
H = 3,16 %,
Ca = 21,15 %.

Gefunden:

C	A = 25,78 %,	B = 25,37 %,	C = 25,60 %,	D = 25,20 %,
		E = 25,62 %,		
H	A = 3,57 %,	B = 3,08 %,	C = 3,39 %,	D = 3,54 %,
		E = 3,44 %,		
Ca	A = 21,64 %,			D = 21,41 %,
		E = 21,52 %,	F = 21,22 %.	

Zusammenfassung.

Die vorstehend beschriebenen Versuche wurden in der Hauptsache im Sommer 1914 ausgeführt; die Veröffentlichung derselben verzögerte sich bis jetzt infolge des Ausbruches des Krieges.

Ich glaube durch meine Versuche mit Bernsteinsäure und Fumarsäure nachgewiesen zu haben, daß bei der Einwirkung von Muskelbrei bei Gegenwart von Sauerstoff auf Bernsteinsäure zwei ganz getrennte Vorgänge zu unterscheiden sind:

Zunächst die Eliminierung von zwei Wasserstoffatomen unter Bildung von Fumarsäure. Diese Reaktion erfolgt quantitativ. Die Menge des verbrauchten Sauerstoffs ist proportional dem Gehalt des Reaktionsgemisches an Bernsteinsäure. Die zur vollständigen Oxydation benötigten Zeiten scheinen der gleichen Abhängigkeit zu unterliegen.

Sodann die Wasseranlagerung an die Doppelbindung der Fumarsäure, wobei optisch-inaktive Äpfelsäure entsteht. Diese Reaktion verläuft nicht quantitativ, sondern führt scheinbar zu einem Gleichgewichtszustande, denn bei den bisher angestellten Versuchen blieben stets ca. 25 % der Fumarsäure unverändert.

Die Versuche, die Wirkungsweise des Succinicoxydons aufzuklären, sollen fortgesetzt werden.

Über die Wasserlöslichkeit des Camphers.

Von

H. Leo und E. Rimbach.

(Aus dem pharmakologischen und dem chemischen Institut der Universität Bonn.)

(Eingegangen am 2. Mai 1919.)

Im Zusammenhange mit den Studien[1]) des einen von uns über die therapeutische Verwendung wäßriger Campherlösungen erschien es angezeigt, den Gehalt der gesättigten wäßrigen Lösung von Campher von neuem zu ermitteln. Die Angaben der Literatur hierüber sind schwankend. Für die Konzentration *C* (g Campher in 100 ccm) finden sich die Werte 0,077 [Flückiger[2])], 0,0833 [Hager[3]) und E. Schmidt[4])] und 0,100 [Husemann[5])] ohne Bekanntgabe der Art ihrer Feststellung. Die von uns hierfür s. Z. vorläufig erhaltene[6]) Zahl C = 0,204 liegt wesentlich höher. Wir haben die Frage aber noch etwas weiter verfolgt und bringen nachstehend eine kurze Übersicht unserer endgültigen Ergebnisse.

Die Bestimmung der gelösten Camphermenge erfolgte polarimetrisch und zwar nach zwei Verfahren; weiter dann auch noch auf chemischem Wege.

---

[1]) Leo, Deutsche med. Wochenschr. **13**, 1913, Münchener med. Wochenschr. **43**, 1913 und Deutsche med. Wochenschr. **11**, 1918.

[2]) Flückiger, Pharmazeutische Chemie **1879**, 356.

[3]) Hager, Handb. d. pharm. Praxis (B. Fischer u. C. Hartwich) **1**, 579.

[4]) E. Schmidt, Lehrb. d. pharm. Chem. **2**, 1389, 1911.

[5]) Husemann, Handb. d. gesamten Arzneimittellehre **1883**, 942.

[6]) Deutsche med. Wochenschr. **13**, 1913.

A. Polarimetrisches Verfahren.

1. Differenzmethode.

Als Lösungsmittel diente mit Rücksicht auf den besonderen Zweck nicht reines Wasser, sondern Ringerlösung. Eine im Wägegläschen genau abgewogene Menge feingepulverten Camphers wurde in ein Liter der Flüssigkeit gebracht und bei mittlerer Temperatur im Schüttelapparat 24 Stunden lang geschüttelt, also bis zum als sicher anzunehmenden Eintritt des Sättigungsgleichgewichts. Es wurde dann rasch abfiltriert, zur Entfernung des Salzes mit etwa 5 ccm Wasser kurz gewaschen und das Wasser mittels der Saugpumpe tunlichst entfernt. Den Gesamtfilterrückstand löste man mit 95 % Alkohol quantitativ zum Volum 50 ccm. Die Drehung der alkoholischen Lösung ergab die ungelöste Camphermenge, ihr Abzug von der in den Schüttelapparat eingebrachten lieferte die Menge des in die wäßrige Lösung Übergegangenen.

	1	2	3	4	5	6	7	
Nummer	Lösungsmittel je 1 Liter	Temperatur t	Gesamtcampher g	Ablenkungsw. des Ungelösten $\alpha_D^{20°}$ $l = 2$ dm	C der alkoh. Lösung ber. n. (2)	Gewicht des Ungelösten g	Gehalt d. wäßrigen Lösung g Campher in 1 Liter	in 100 ccm = C
1	Ringerlösung	mittel	6,530	7,421	8,991	4,495	2,035	0,204
2	Ringerlösung	„	6,390	7,169	8,694	4,347	2,043	0,204
3	Ringerlsg. m. 2 % Alk.	„	7,870	9,108	10,973	5,486	2,384	0,238
4	Ringerlsg. m. 5 % Alk.	„	9,286	11,008	13,180	6,590	2,696	0,270

Aus Lösung 1 und 2 ergibt sich übereinstimmend $C = 0{,}204$ als Sättigungskonzentration des Camphers in Ringerlösung; Alkoholzusatz bringt eine zu erwartende Steigerung, einigermaßen proportional der Alkoholmenge.

Zu den polarimetrischen Messungen diente ein großer Lippichscher Halbschattenapparat, dessen Nonien 0,01° lieferten. Jedes α ist das Mittel einer Serie und bleibt mit seinem wahrscheinlichen Fehler unter $\pm 0{,}01°$. Die Temperatur der Lösungen wurde durch Wasserbadröhre auf $20° \pm 0{,}1$ konstant gehalten. Zur Ermittelung der Konzentration der alkoholischen Lösung aus ihrer Drehung sei folgendes bemerkt. Die spezifische Drehung $[\alpha]$ des Camphers wird zunächst von der Stärke des Alkohols beeinflußt. Eine Lösung von 6,166 g des benutzten Camphers in 95 % Alkohol lieferte $\alpha_D^{20°}$ im 4-dm-Rohr $= 10{,}092°$

und daraus $[\alpha]_D^{20°} = 40{,}92$. Für die gleiche Konzentration fand Landolt[1]) in absolutem Alkohol $[\alpha]_D^{20} = 42{,}71$, Hesse[2]) in 80% Alkohol, t_m; 39,25. Unser Wert paßt sich also gut ein. Weiter aber hängt die spezifische Drehung des Camphers von der relativen Menge des Lösungsmittels ab. Für diese Abhängigkeit gibt Landolt[3]) auf Grund seiner Versuche mit absolutem Alkohol die Interpolationsformel:

$$[\alpha]_D^{20°} = 41{,}982 + 0{,}11824\,C \tag{1}$$

Diese Formel mußte für 95% Alkohol umgeändert werden. Dies geschah auf Grund unserer angeführten Bestimmung der spezifischen Drehung in 95% Alkohol, unter gleichzeitiger Annahme, daß wohl die Drehung selbst mit der Alkoholstärke sich ändert, nicht aber, innerhalb der in Betracht kommenden Grenzen, der Wert $d\,[\alpha]\,/\,d\,C$, der in obiger Formel in der zweiten Konstanten sich darstellt. So erhielt man die für 95% Alkohol geltende Formel:

$$[\alpha]_D^{20} = 40{,}20 + 0{,}11824\,C, \tag{2}$$

aus der dann die in Spalte 5 der Tafel angeführten C mittels Näherungsrechnung sich ableiten.

Trotz der, wohl mehr zufälligen, völligen Übereinstimmung der beiden Bestimmungen 1 und 2 ist ihr Ergebnis als zu hoch anzusehen, als eine obere Grenze für den tatsächlichen Wert. Beim Abfiltrieren und Absaugen des ungelösten Camphers tritt infolge seines nicht unerheblichen Dampfdruckes Verlust ein; die Werte für C in Spalte 5 werden dadurch zu niedrig und die Differenz in Spalte 7 zu hoch. Wir griffen deshalb noch zur unmittelbaren Bestimmung.

2. Direktes Verfahren.

Von vier gesonderten, in oben beschriebener Weise mit Ringerlösung hergestellten gesättigten Campherlösungen wurden je 300 ccm mit kleinen Mengen Benzol sukzessive ausgeschüttelt und die einzelnen Ausschüttelungen vereinigt bis zum Volum 60 ccm. Diese benzolischen Campherlösungen ergaben folgende Drehungswinkel.

Nummer	Sättigungs-Temperatur t	α_D^{20} für Rohrlänge $l = 2$ dm	Campher-Konzentration C (g in 100 ccm Benzol) ber. nach (3)	g Campher in 60 ccm Benzol = 300 ccm Wasser	g Campher in 100 g wäßr. Lös. C	C im Mittel
1	mittlere	0,604°	0,7453	0,4472	0,1491	0,157
2	mittlere	0,667°	0,8213	0,4928	0,1643	
3	37,5°	0,561°	0,6922	0,4153	0,1385	0,140
4	37,5°	0,576°	0,7094	0,4256	0,1419	

1) Landolt, Liebigs Ann. 189, 333.
2) Hesse, Liebigs Ann. 176, 119.
3) Landolt, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 204, 1888.

Für die Anordnung der Drehungsmessungen und ihre Fehlergrenzen gilt das unter 1 Gesagte. Die spezifische Drehung des Camphers in Benzol ist von mehreren Seiten[1]) untersuch und durch Interpolationsformeln festgelegt, die untereinander übereinstimmende Werte liefern. Wir benutzten zur obigen Rechnung die Formel von Förster:

$$ {}^{20^\circ}_{D} C = 2{,}4683 \frac{\alpha}{l} - 0{,}01747 \left(\frac{\alpha}{l}\right)^2, \tag{3} $$

weil sie in bequemer Weise die Konzentration als unmittelbare Funktion des Drehungswinkels darstellt.

Auch diesen Mittelwerten haftet ein, wenn auch kleiner, doch konstanter Fehler an. Trotz der großen Löslichkeit in Benzol gegenüber Wasser wird beim Ausschütteln ein allerdings sehr geringfügiger Rest des Camphers in der wäßrigen Flüssigkeit verbleiben und sich der Bestimmung entziehen. Der Mittelwert aus den Bestimmungen 1 und 2 stellt also eine untere Grenze für den gesuchten wirklichen Wert dar.

Eine einfache Mittelbildung aus den Resultaten der beiden Verfahren würde dem Umstand nicht genügend Rechnung tragen, daß der Fehler der ersten Methode unbestreitbar größer ist als der der zweiten. Wir legen deshalb dem Ergebnis der ersten Methode nur das halbe Gewicht bei, gegenüber dem der zweiten und erhalten so aus den Drehungsmessungen den Endwert:

$$ \underline{C} = \frac{0{,}204 + 2 \cdot 0{,}157}{3} = \underline{0{,}173} $$

als den wahrscheinlichsten Wert der Sättigungskonzentration des Camphers in Ringerlösung bei mittlerer Temperatur.

Aus den Bestimmungen 3 und 4 ergibt sich, daß mit steigender Temperatur die Löslichkeit des Camphers sinkt, ein Verhalten, wie es auf Grund qualitativer Beobachtungen der eine von uns (L.) bereits früher[2]) festgestellt hat.

B. Chemisches Verfahren.

Anschließend an die beschriebenen Versuche arbeitete Herr Dr. Tischner, Chemiker im wissenschaftlichen Laboratorium der Firma E. Merck in Darmstadt, ein Verfahren aus,

---

[1]) Landolt, Liebigs Ann. **189**, 334, 1877; Förster, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **23**, 2984, 1890; Rimbach, Zeitschr. f. physikal. Chem. **9**. 698, 1892.

[2]) H. Leo, Deutsche med. Wochenschr. **13**, 1913.

das die Bestimmung der Sättigungskonzentration des Camphers in wäßriger Lösung auf chemischem Wege gestattet. Herr Dr. Tischner ist leider auf dem Felde der Ehre gefallen. Seinen uns zugegangenen Mitteilungen entnehmen wir das Nachstehende über die Methode und ihre Leistungen.

Untersuchungsverfahren.

„Zunächst zeigte sich, daß bei dem geringen Gehalt der wäßrigen Campherlösung die üblichen Reagenzien auf Campher sämtlich versagen bis auf Permanganat. Nun ist zwar bekannt, daß überschüssiges alkalisches Permanganat auf Campher nicht einheitlich wirkt: die zunächst entstehende Camphersäure wird zum Teil weiter oxydiert, auch bleibt ein wenig Campher unangegriffen. Aber es fand sich, daß unter gleichen Versuchsbedingungen (Konzentration, Temperatur, Zeit) die Oxydation stets gleichweit vorschreitet, so daß man also mit Hilfe einer Vergleichslösung von bekanntem Gehalt den Gehalt einer unbekannten Campherlösung durch Titration mit Permanganat ermitteln kann.

1,500 g reinster, resublimierter Campher wurde durch etwa fünfstündiges Schütteln bei Zimmertemperatur in etwa 990 ccm Wasser gelöst und die Lösung auf 1000 ccm aufgefüllt. Die ganz schwach opake Flüssigkeit klärt sich beim Filtrieren durch eine „Kerze“ vollständig. Von dieser Lösung werden genau 10 ccm abpipettiert, 10 ccm 6 bis 7 %ige Natronlauge und genau 25 ccm 0,1 n-$KMnO_4$ zugefügt. Ganz ebenso wird mit der zu untersuchenden Campherlösung verfahren; beide Flüssigkeiten erhitzt man dann auf demselben Dampfbad unter Rückflußkühlung. Nach genau einer Stunde wird der Dampf abgestellt und die Kühler werden ausgespült. Die auf Handwärme abgekühlte Flüssigkeit versetzt man mit 30 ccm 10%iger Schwefelsäure und genau 25 ccm 0,1 n-Ferroammonsulfat. Nachdem unter Schütteln der Manganniederschlag klar gelöst ist, wird mit Permanganat auf schwach rosa Färbung zurücktitriert. Die Versuche werden mehrfach ausgeführt und die Mittelwerte gezogen.

Bei strengem Innehalten der ausgemittelten Versuchsbedingungen verbrauchte eine Standardlösung von 0,150 g Campher in 100 ccm im Mittel 7,9 ccm 0,1 n-$KMnO_4$. Die größte beobachtete Abweichung betrug 0,4 ccm = 0,0008 g Campher. Verbraucht die Standardlösung X, die zu untersuchende Y ccm $KMnO_4$, so hat die letztere also einen Gehalt von Y/X. 0,150 g Campher in 100 ccm.

Voraussetzung bei der Titration ist, daß die Konzentration der zu untersuchenden Flüssigkeit nicht allzuweit von 0,150 abweicht. Beträgt sie weniger als 0,100, so erhält man nur dann scharfe Werte, wenn man den Überschuß von $KMnO_4$ usw. entsprechend verringert. Bei einem Gehalt von 0,05 g auf 100 ccm z. B. wurden mit 10 ccm Permanganat und 4 ccm Lauge richtige Zahlen erzielt.

Löslichkeitsbestimmungen. Die untersuchten Lösungen stellte man (mit Ausnahme des Standards) aus dem Camphor. raff. des Arzneibuchs dar. Weil dieser sich nicht so gut pulvern läßt als das frisch sublimierte Präparat, mußte er mit ganz wenig Wasser in einer Reibschale verrieben und durch etwa 20maliges Nachspülen quantitativ in das Schüttelgefäß übergeführt werden. Die Temperatur war 14 bis 17°.

Hierbei gingen 0,5 g; 1,0 g; 1,5 g pro Liter schon innerhalb einiger Stunden völlig in Lösung, und die Titration der erhaltenen Lösungen ergab die richtigen Werte. 1,6 g brauchten etwa 30 Stunden und 2,0 g wurden auch nach 96stündigem Schütteln nicht restlos gelöst. Bereits hieraus kann man schließen, daß die Sättigungskonzentration zwischen 0,16 und 0,20 liegen muß, wahrscheinlich näher dem ersteren Wert.

Eine Anzahl bei mittlerer Temperatur gesättigter Lösungen, erhalten durch 4tägiges Schütteln, ergab bei der Titration als Sättigungskonzentration:

$$\underline{C = 0{,}167\ \mathrm{g}}\ \text{in 100 ccm.}$$

Aus der klaren, bei gewöhnlicher Temperatur gesättigten wäßrigen Lösung waren nach 2stündigem Schütteln bei 39° Campherkriställchen abgeschieden; Schütteln über Nacht bei 15° brachte sie wieder in Lösung. Bei neuerlichem Erwärmen fielen sie wieder aus usf. Dies bestätigt die oben erwähnte Feststellung, daß die Löslichkeit mit steigender Temperatur sinkt. In einem Einzelversuch fand sich die Konzentration der Lösung bei 39° zu 0,160, also etwas über 4% des Wertes geringer als bei Zimmertemperatur."

Zusammenfassung.

1. Die Löslichkeit des Camphers bei gewöhnlicher Temperatur in Ringerlösung wurde auf polarimetrischem Wege, nach verschiedenen Verfahren, im Mittel gefunden zu 0,173 g in 100 ccm Lösung = 1 : 577. In reinem Wasser ergab sie sich, auf chemischem Wege, bei mittlerer Temperatur zu 0,167 g in 100 ccm Lösung = 1 : 598.

Der Unterschied beider Werte fällt z. T. in die Fehlergrenzen; der Salzgehalt der Ringerlösung ist also von nur geringfügigem Einfluß.

2. Der Löslichkeitswert des Camphers in Wasser liegt wesentlich höher, fast doppelt so hoch, wie bis dahin allgemein angenommen wurde.

3. Mit steigender Temperatur sinkt die Löslichkeit. Die Auflösung des Camphers in Wasser ist also, nach den Sätzen der Thermodynamik, ein exothermer, unter Wärmeentwicklung sich vollziehender Vorgang.

Über die Photosynthese des Formaldehyds und des Zuckers.

Von

P. R. Kögel.

(Eingegangen am 2. Mai 1919.)

Die Kohlensäureassimilation in der Pflanze wird bekanntlich durch folgende Formelgleichungen dargestellt:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O = C_6H_{12}O_2 + 6\,O_2.$$

Nimmt man Formaldehyd als Übergangsstoff an, so gilt für die Zwischengleichung

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O = \underset{\text{Formaldehyd}}{6\,HCOH} + 6\,O_2.$$

Die Bildung der in der Pflanze nachgewiesenen Stärke aus Formaldehyd oder Zucker bringt man summarisch in folgender Weise zum Ausdruck:

$$\underset{\text{Formaldehyd}}{6\,HCOH} - H_2O = \underset{\text{Stärke}}{C_6H_{10}O_5}$$

$$\underset{\text{Zucker}}{C_6H_{12}O_6} - H_2O = \underset{\text{Stärke}}{C_6H_{10}O_5}.$$

Die Hypothese der Bildung des Formaldehyds als erstes, zunächst nicht faßbares Produkt der Kohlensäureassimilation in der Pflanze wurde einst durch v. Bayer aufgestellt[1]). Wenn nun im Laufe der Zeit — während annähernd 50 Jahren — manche Beobachtungen bekannt wurden, die diese Annahme stützen, so war es bisher doch nicht möglich, Formaldehyd als photochemisches Assimilationsprodukt in der Pflanze sicher nachzuweisen. Diese Tatsache spricht jedoch keineswegs gegen die v. Bayersche Annahme, da der Aldehyd bereits in seiner

[1]) Die gegenwärtigen Verhältnisse ermöglichen es mir nicht, die Orginalabhandlung von v. Bayer u. a. nachzusehen.

Entstehungsform oder noch unmittelbar vorher zur Zuckersynthese verwendet werden kann, wofür wir theoretische Gründe alsbald kennen lernen werden.

Die Herstellung des Formaldehyds bzw. Zuckers aus $CO_{2\,n}$ und H_2O_n ist chemisch ohne Lichtwirkung auf verschiedene Weise verwirklicht worden. Die photochemische Synthese des Formaldehyds wurde von D. Berthelot und Gaudechon[1]) durch Bestrahlung von Kohlendioxyd in Gegenwart von Wasserstoff durchgeführt. Offenbar kann man diese Synthese nicht ohne weiteres der biologischen gleichstellen, da die Bedingungen sehr verschieden sind. Damit überhaupt irgendeine Photosynthese des Formaldehyds bzw. des Zuckers in die biologische Versuchsordnung eingereiht werden kann, muß die Bildung der Zwischenprodukte bestimmt, d. h. photochemisch begründet werden. Dies soll im folgenden geschehen.

Eine systematische Prüfung bisher bekannter photochemischer Reaktionen über Enol-Ketoumlagerungen ließ mich diese Umwandlung als eine sehr häufig stattfindende erkennen. Für unsere Zwecke wähle ich ein Beispiel, das den Vorgang klar zum Ausdruck bringt.

Benzil $C_6H_5 \cdot CO \cdot CO \cdot C_6H_5$ liefert am Licht unter Wasserstoffaufnahme Benzil-Benzoin, wie einst Klinger[2]) festgestellt und Ciamician und Silber[3]) bestätigt haben.

$$\underset{\text{Benzil}}{3\,C_6H_5 \cdot CO \cdot CO \cdot C_6H_5} + H_2 = 2\,C_6H_5 \cdot \\ \underset{\text{Benzil-Benzoin}}{\cdot CO \cdot CO \cdot C_6H_5 \cdot C_6H_5 \cdot CO \cdot CH(OH)C_6H_5}$$

Das Licht vollführt eine doppelte Aufgabe, die Bildung des Benzoins und seine Anlagerung an Benzil.

Der erste Vorgang, der für uns von Bedeutung ist, soll auf folgende Weise dargestellt werden:

$$\underset{\text{Benzil}}{\begin{array}{l} C_6H_5 \cdot C = O \\ \quad\quad\;\; | \\ C_6H_5\;\; C = O \end{array}} + H_2 \quad \underset{\text{Stilbendiol}}{\begin{array}{l} C_6H_5 \cdot C - OH \\ \quad\quad\;\; \| \\ C_6H_5 \cdot C - OH \end{array}} \longrightarrow \underset{\text{Benzoin}}{\begin{array}{l} C_6H_5 \cdot C = O \\ \quad\quad\;\; | \\ C_6H_5 \cdot CH(OH) \end{array}}$$

Der Übergang des Stilbendiols in Benzoin entspricht der Enol-Ketoumlagerung. Die Bildung des Zwischenproduktes,

---

1) Compt. rend. **150**, 1690, 1910.

2) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 1864, 1886.

3) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, III, 3594.

des Stilbendiols, wurde von Thiele durch die Fassung entsprechender Acetatderivate bestimmt.

Dieser bei aromatischen Verbindungen festgestellte Vorgang würde auf aliphatischem Gebiete in folgender Weise zur Photosynthese des Formaldehyds führen. Zwei Moleküle Kohlensäure (CO_2) bilden ein einfaches Polymeres. Die freien Valenzen befähigen es dazu. Die Photopolymerisation ist ein weitverbreiteter bekannter Vorgang. An die Sauerstoffatome lagert sich — wie beim Benzil — Wasserstoff an, was die freien Valenzen naturgemäß vermitteln[1]).

$$\underset{2\,CO_2}{\begin{array}{c} O=C=O \\ \vdots \\ O=C=O \end{array}} + 2\,H_2O = \underset{\text{Tetraoxyäthylen}}{\begin{array}{c} HO-C-OH \\ \| \\ HO-C-OH \end{array}} + O_2 .$$

Bei dem Übergang der Enol- in die symmetrische Ketoverbindung müßten sich die Valenzen kreuzen, wodurch eine Teilung des Moleküls unter Abspaltung von Sauerstoff eintritt. Dadurch entsteht Formaldehyd HCOH. Zugleich ist das Kerngerüst für Zucker gegeben.

$$\underset{\text{Enolform}}{\begin{array}{c} H \\ OH-\dot{C}-OH \\ \| \\ OH-C-OH \\ \dot{H} \end{array}} \longrightarrow \underset{\text{Ketoform}}{\begin{array}{c} H \\ OH-\dot{C}-\;O \\ | \diagup \\ O-C-OH \end{array}} \longrightarrow \underset{\text{Formaldehyd}}{\begin{array}{c} H\cdot COH \\ \\ H\cdot COH \end{array}} + O_2$$

$$\underset{\substack{\text{Traubenzucker} \\ \text{(Gewöhnliche Formel)}}}{\begin{array}{c} C\cdot OH \\ | \\ H\cdot \dot{C}\cdot OH \\ OH\cdot \dot{C}\cdot H \\ H\cdot \dot{C}\cdot OH \\ H\cdot \dot{C}\cdot OH \\ \dot{C}H_2OH \end{array}} \qquad \underset{\substack{\text{Traubenzucker} \\ \text{(Äthylenoxyd-Formel)}}}{\begin{array}{c} H \\ HO-\dot{C}-O\,\rceil \\ HO-\dot{C}-H \;| \\ H-\dot{C}-\!-\!\rfloor \\ H-\dot{C}-OH \\ H-\dot{C}-OH \\ \dot{C}H_2OH \end{array}}$$

---

[1]) Die gleiche Anlagerung des Wasserstoffes durch Licht findet man auch bei der Bildung des Hydrochinons und Chinhydrons $C_6H_4O_2 \cdot C_6H_4(OH)_2$ aus Chinon und bei anderen photochemischen Reaktionen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, III, 3594 ff.

Die Verbindung zweier Moleküle Formaldehyd und zwar auch hier im Sinne der photochemischen Benzoinbildung, führt am Licht zu den Endgruppen[1]) $COH \cdot CH_2OH$:

$$\begin{matrix} H \\ H \end{matrix}\!>C=O \;\; \vdots \;\; O=C\!<\!\begin{matrix} H \\ H \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} HCOH \\ \| \\ OHCH \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} CH_2 \cdot OH \\ | \\ CHO \end{matrix}$$

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 44, 1035, 1911.

Autorenverzeichnis.

Acél, D. Über Resistenz der roten Blutkörperchen bei Stickstoffdefizit und bei Inanition. S. 211.
Armbrecht, Walther. Beiträge zur Kenntnis der Chitose. S. 108.
Beumer, H. Zur pathogenetischen Bedeutung der Ölsäure bei Anämien. S. 239.
Boas, Friedrich, und Hans Leberle. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. III. Mitteilung. S. 169.
Brinkman, R. Einige Bemerkungen über die Bedeutung des Blutkalks. S. 101.
Dienes, L. Studien zur quantitativen Bestimmung sehr geringer Ca-, Mg- und P-Mengen in tierischen Substanzen. S. 131.
Einbeck, Hans. Über quantitative Versuche mit dem Succinicoxydon von Battelli und Stern. S. 296.
Flury, Ferdinand, und Wolfgang Heubner. Über Wirkung und Entgiftung eingeatmeter Blausäure. S. 249.
Gonnermann, M. Der Eisengehalt der Öle, Fette, Wachsarten, Harze, Gummiharze, Gummiarten; sowie einige Analysen über den Gehalt an Kieselsäure und Tonerde. S. 286.
Halberkann, J. Chinin und Hydrochinin im menschlichen Organismus. Verhalten des Chinins gegen rote Blutkörperchen. S. 24.
Hári, Paul. Über die Lichtabsorption neutraler Lösungen von Oxyhämoglobin. S. 257.
— Ist das Absorptionsverhältnis (Vierordt) ein von der Art des verwendeten Apparats (Spektrophotometer) unabhängiger, charakteristischer Wert? S. 266.
Heubner, Wolfgang, s. Flury.
Jacoby, Martin. Über Bakterien-Katalase. III. Mitteilung. S. 124.
Kögel, P. R. Über die Photosynthese des Formaldehyds und des Zuckers. S. 313.
Kornfeld, Klara, und Heinrich Lax. Untersuchungen über die Wärmetönung von Enzymreaktionen. V. Mitteilung. Über die Wärmetönung der Organautolyse. S. 272.
Lange, C. Über Jod-Stärkereaktion und ihre Verwendung für eine colorimetrische Eiweißbestimmung bei Immunitätsprozessen. S. 46.
Lax, Heinrich, s. Kornfeld.
Leberle, Hans, s. Boas.
Leo, H., und E. Rimbach. Über die Wasserlöslichkeit des Camphers. S. 306.
Nord, F. F. Biochemische Bildung von Aminoäthylalkohol aus Serin. S. 281.
Nottbohm, F. E. Ist die Milch altmelker Kühe als Säuglingsnahrung geeignet? S. 1.
Richter-Quittner, M. Zur Methodik der chemischen Blutanalyse. I. Kritik der Enteiweißungsmethoden. S. 179.
Rimbach, E., s. Leo.
Rosenstein, Hedwig, s. Traube.
Schilling, Karl. Beitrag zur Lehre von der Blutgerinnung. S. 220.
Traube, J., und Hedwig Rosenstein. Über die Wirkung von oberflächenaktiven Stoffen auf Pflanzensamen. S. 85.
Trendelenburg, Paul. Quantitative Messungen über die Spaltung des Hexamethylentetramins. S. 146.
Tunmann, O. Über die Alkaloide bei Verwundungen der Pflanzen. S. 164.
Vécsei, Anna. Beitrag zur Kenntnis der Hämagglutinine und Hämolysine. S. 205.



